

# **Analyse unterschiedlich glykosylierter Isoformen des extrazellulären Matrixproteins BM-40/SPARC/Osteonectin in verschiedenen Zell- und Gewebesystemen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Brigitte Kaufmann  
aus Herten

Köln 2001

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Paulsson

Prof. Dr. J.C. Howard

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2002

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>BM-40/SPARC/Osteonectin</b>	<b>3</b>
2.1.1	Expression von BM-40	3
2.1.2	Struktur von BM-40	4
2.1.3	Posttranslationale Modifizierung	6
2.1.4	Funktionelle Studien	7
<b>2.2</b>	<b>Glykosylierung von Proteinen</b>	<b>9</b>
2.2.1	Strukturelle Eigenschaften	10
2.2.2	Biosynthese	11
2.2.3	Biologische Rolle der Glykosylierung von Proteinen	12
<b>2.3</b>	<b>Aufbau und Stoffwechsel des Knochens</b>	<b>13</b>
<b>2.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchung des N-Glykosylierungstyps verschiedener Zell-linien</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Rekombinante Expression von humanem BM-40</b>	<b>20</b>
3.2.1	Klonierung	20
3.2.2	Rekombinante Expression von BM-40 in EBNA-293-Zellen	21
3.2.3	Rekombinante Expression von BM-40 in der humanen Osteosarkomzelllinie SaOS-2	22
3.2.4	Rekombinante Expression von BM-40 in der humanen Osteosarkomzelllinie MHH-ES-1	24

<b>3.3</b>	<b>Isolierung von BM-40 aus Gewebe</b>	<b>25</b>
3.3.1	Isolierung von BM-40 aus humanem Knochen	25
3.3.2	Isolierung von BM-40 aus Maus-EHS-Tumor	28
<b>3.4</b>	<b>Glykosylierungsmuster der gereinigten Proteine</b>	<b>29</b>
<b>3.5</b>	<b>Affinitätschromatographie mit Concanavalin A</b>	<b>31</b>
3.5.1	His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen	31
3.5.2	BM-40 isoliert aus humanem Knochen	34
<b>3.6</b>	<b>MALDI-TOF Massenspektrometrie</b>	<b>36</b>
<b>3.7</b>	<b>Circular Dichroismus-Spektroskopie</b>	<b>37</b>
<b>3.8</b>	<b>Analyse der in BM-40 auftretenden N-Glykane</b>	<b>40</b>
3.8.1	Bestimmung des Sialinsäuregehaltes	40
3.8.2	Untersuchung der N-Glykan-Strukturen	43
<b>3.9</b>	<b>Zellkulturmodell für eine mineralisierte Matrix</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolierung von BM-40 aus verschiedenen Quellen</b>	<b>66</b>
<b>4.2</b>	<b>Posttranslationale Modifizierung von BM-40</b>	<b>68</b>
4.2.1	Glykosylierungsmuster der verschiedenen Proteine	68
4.2.2	Affinitätschromatographie mit Concanavalin A	69
4.2.3	Analyse mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie	70
4.2.4	Aufklärung der N-Glykan-Strukturen von BM-40	73
<b>4.3</b>	<b>CD-Spektroskopie</b>	<b>82</b>
<b>4.4</b>	<b>Lokalisation von BM-40 in einem Zellkulturmodell einer mineralisierten Extrazellulärmatrix</b>	<b>83</b>

<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>86</b>
<b>5.1</b>	<b>Molekularbiologie</b>	<b>86</b>
5.1.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	86
5.1.1.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	86
5.1.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	86
5.1.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten und Reinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen	87
5.1.1.4	Ligation	87
5.1.1.5	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)	87
5.1.1.6	Plasmid-Präparationen	87
5.1.1.7	DNA-Sequenzierung	88
5.1.2	Klonierung der Plasmide zur rekombinanten Expression von humanem BM-40	88
5.1.2.1	Herstellung des Konstrukts pCEP-Pu/BM-40	88
5.1.2.2	Herstellung des Konstrukts SP-his6-myc-fX-BM-40-pCEP-Pu	88
<b>5.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>89</b>
5.2.1	Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zelllinien	89
5.2.2	Transfektion und Selektion der verwendeten Zelllinien	90
5.2.3	Ernte serumfreier Überstände	90
5.2.4	Zellkulturmodell einer mineralisierten Knochenmatrix	90
<b>5.3</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>91</b>
5.3.1	Immunoblot	91
5.3.2	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	92
<b>5.4</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>93</b>
5.4.1	Allgemeine proteinchemische Methoden	93
5.4.1.1	Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA-Fällung)	93
5.4.1.2	Proteinfällung mit Ethanol	93
5.4.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	93
5.4.1.4	Coomassie-Färbung	94
5.4.1.5	Silberfärbung	94
5.4.1.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	94
5.4.2	Chromatographische Methoden	95
5.4.2.1	Ionenaustauschchromatographie	95
5.4.2.2	Affinitätschromatographie mittels Histidinmotiv	96
5.4.2.3	Affinitätschromatographie mit Hitrap Heparin	96
5.4.2.4	Affinitätschromatographie mit Concanavalin A (Con A)	96

5.4.3	Extraktion von BM-40 aus humanem Knochenmehl	97
5.4.4	Extraktion von EHS-Tumor	97
5.4.5	Extraktion der extrazellulären Matrix von SaOS-2-Zellen	97
5.4.6	MALDI-TOF Massenspektrometrie	98
5.4.7	Circular Dichroismus-Spektroskopie	98
<b>5.5</b>	<b>Glykoanalytik</b>	<b>100</b>
5.5.1	Analyse des N-Glykosylierungstyps mit N-Glykosidase F und Endo H	100
5.5.2	Freisetzung und Fluoreszenzmarkierung von N-Glykanen	100
5.5.3	Behandlung mit terminalen Glykosidasen	101
5.5.4	HPLC-Analyse von fluoreszenzmarkierten N-Glykanen	101
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>112</b>

Erklärung

Danksagung

Kurzzusammenfassung

Abstract

Lebenslauf

# 1 Zusammenfassung

Bisher sind zwei verschiedene BM-40-Isoformen bekannt, die sich hinsichtlich ihres N-Glykosylierungstyps unterscheiden. BM-40 besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen jedoch nach bisherigen Erkenntnissen nur eine verwendet wird. O-Glykosylierungen sind für BM-40 nicht bekannt. BM-40 aus humanen Blutplättchen trägt eine N-Glykosylierung vom komplexen Typ, während BM-40 aus humanem Knochen eine mannose-reiche N-Glykosylierung aufweist (Kelm and Mann, 1991). Für diese Glykoformen wurden aufgrund von unterschiedlichen Kollagen-Bindungseigenschaften unterschiedliche biologische Funktionen vermutet.

Humanes BM-40 vom Knochen- als auch vom Blutplättchen-Glykosylierungstyp sollte rekombinant exprimiert werden. Für die Expression von komplex und damit blutplättchen-ähnlich glykosyliertem BM-40 wurde die humane embryonale Nierenzelllinie EBNA-293 ausgewählt. Um BM-40 vom Knochen-Typ herzustellen, wurden zuerst verschiedene Zelllinien mit einem osteoblasten-ähnlichen Phänotyp hinsichtlich ihres N-Glykosylierungstyps von BM-40 durch Behandlung mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H untersucht. Überraschenderweise exprimierten nahezu alle untersuchten Zelllinien BM-40 mit einer komplexen und damit eher blutplättchen-ähnlichen Glykosylierung. Nur die humane Osteosarkomzelllinie MHH-ES-1 exprimierte BM-40, welches zumindest zum Teil Endoglykosidase H sensitiv und damit mannose-reich glykosyliert war. Somit wurde diese Zelllinie für die rekombinante Expression von knochen-ähnlichem BM-40 verwendet. Weiterhin erfolgte die rekombinante Expression von BM-40 in der humanen Osteosarkomzelllinie SaOS-2. Im Fall der MHH-ES-1-Zellen wurde das rekombinante Protein aufgrund einer geringen Expression in Form eines Fusionsproteins mit einer N-terminalen His6-myc-fX-Sequenz exprimiert, um die Aufreinigung zu erleichtern. Zusätzlich wurde das Protein aus humanem Knochen sowie aus dem Basalmembran-produzierenden Maus-EHS-Tumor aufgereinigt.

Die Analyse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie der rekombinanten und aus Gewebe isolierten Proteine sowie von kommerziell erhältlichem BM-40 aus humanen Blutplättchen ergab aus der Differenz von unbehandelten und mit N-Glykosidase F behandelten Proben eine mittlere Masse der N-Glykane, die je nach Herkunft des Proteins zwischen 1.5 und 2.7 kDa lag. Das Molekulargewicht der deglykosylierten Proteine ließ darauf schließen, daß BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen und EHS-Tumor keine weitere posttranslationale Modifizierung trägt.

Dagegen ist BM-40 aus EBNA-293-Zellen, SaOS-2-Zellen, humanem Knochen und humanen Blutplättchen wahrscheinlich noch zusätzlich posttranslational modifiziert. Die Art dieser Modifizierung konnte bisher nicht geklärt werden.

Die Analyse der N-Glykan-Strukturen ergab nur für BM-40 aus Blutplättchen und EBNA-293-Zellen ausschließlich komplexe Strukturen. Diese waren bi- bzw. triantennär, wobei bei EBNA-293-BM-40 überwiegend (93 %) triantennäre Glykane auftraten. Ebenfalls vorhanden war eine core-Fukosylierung (EBNA-293-BM-40: 71 %, Blutplättchen-BM-40: 100 %) bzw. ein „bisecting“ N-Acetylglukosamin (GlcNAc) (EBNA-293: 76 %, Blutplättchen: 30 %). Für EBNA-293-BM-40 wurde ein deutlicher Mangel an terminalen Galaktosen und demzufolge auch ein geringer Anteil an sialinylierten Strukturen (18 %) beobachtet. BM-40 aus SaOS-2-Zellen bzw. Maus-EHS-Tumor trägt nur biantennäre Strukturen, überwiegend vom komplexen Typ und zu einem geringen Teil vom Hybrid-Typ. Alle N-Glykane von EHS-BM-40 sind core-fukosyliert. SaOS-2-BM-40 weist zum Teil ebenfalls core-Fukosylierung (87% der Glykane) und ein „bisecting“ GlcNAc (36%) auf. Nur BM-40 aus Knochen und MHH-ES-1-Zellen besitzt N-Glykan-Strukturen vom Oligomannose-Typ. MHH-ES-1-Zellen exprimieren alle N-Glykan-Strukturen, die auf Knochen-BM-40 gefunden wurden, nämlich neben N-Glykanen vom Oligomannose-Typ, biantennäre komplexe Strukturen, zum Teil mit core-Fukosylierung. Die Zusammensetzung ist jedoch unterschiedlich. Weiterhin bestehen 28 % der N-Glykane von rekombinantem MHH-ES-1-BM-40 aus Hybrid- bzw. triantennären komplexen Strukturen, die in Knochen-BM-40 nicht auftreten.

Mit der rekombinanten Expression eines breiten Spektrums an unterschiedlichen BM-40-Glykoformen sowie der detaillierten Aufklärung der N-Glykan-Strukturen von rekombinantem und aus Gewebe isoliertem BM-40 wurden die Voraussetzungen geschaffen, um ausgehend von den Unterschieden in der Glykosylierung von Blutplättchen- und Knochen-BM-40 einen eventuellen Einfluß der Glykosylierung auf die Funktion des Proteins zu untersuchen. Weiterhin kann mit den unterschiedlichen Glykoformen ein diagnostisches Testsystem zur Erkennung von Knochenstoffwechselstörungen mit BM-40 als Marker aufgebaut werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde in einem auf SaOS-2-Zellen beruhendem Modell einer mineralisierten Matrix die Lokalisation von BM-40 untersucht. In Immunfluoreszenzfärbungen konnte dabei nur eine begrenzte Colokalisation von BM-40 mit Kollagen I beobachtet werden. Eine sequenzielle Extraktion der Extrazellulärmatrix unterschiedlich kultivierter SaOS-2-Zellen ergab einen Einbau von BM-40 in die Extrazellulärmatrix. Nach drei Wochen postkonfluenter Kultivierung unter geeigneten Bedingungen erfolgte auch ein Einbau in die mineralisierte Matrix.



## **2 Einleitung**

### **2.1 BM-40/SPARC/Osteonectin**

Das extrazelluläre, calciumbindende Protein BM-40 (SPARC, Osteonectin) wurde erstmals von Termine et al. (1981) als eines der wichtigsten, nicht-kollagenen Proteine in bovinem und humanem Knochen beschrieben und mit Osteonectin bezeichnet. Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, daß dieses Protein mit SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteines), einem Protein, das von Endothelzellen und Fibroblasten sekretiert wird (Sage et al., 1984), und BM-40, einem aus dem Basalmembran produzierenden Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor (EHS-Tumor) isolierten Protein (Dziadek et al., 1986), identisch ist (Mann et al., 1987).

#### **2.1.1 Expression von BM-40**

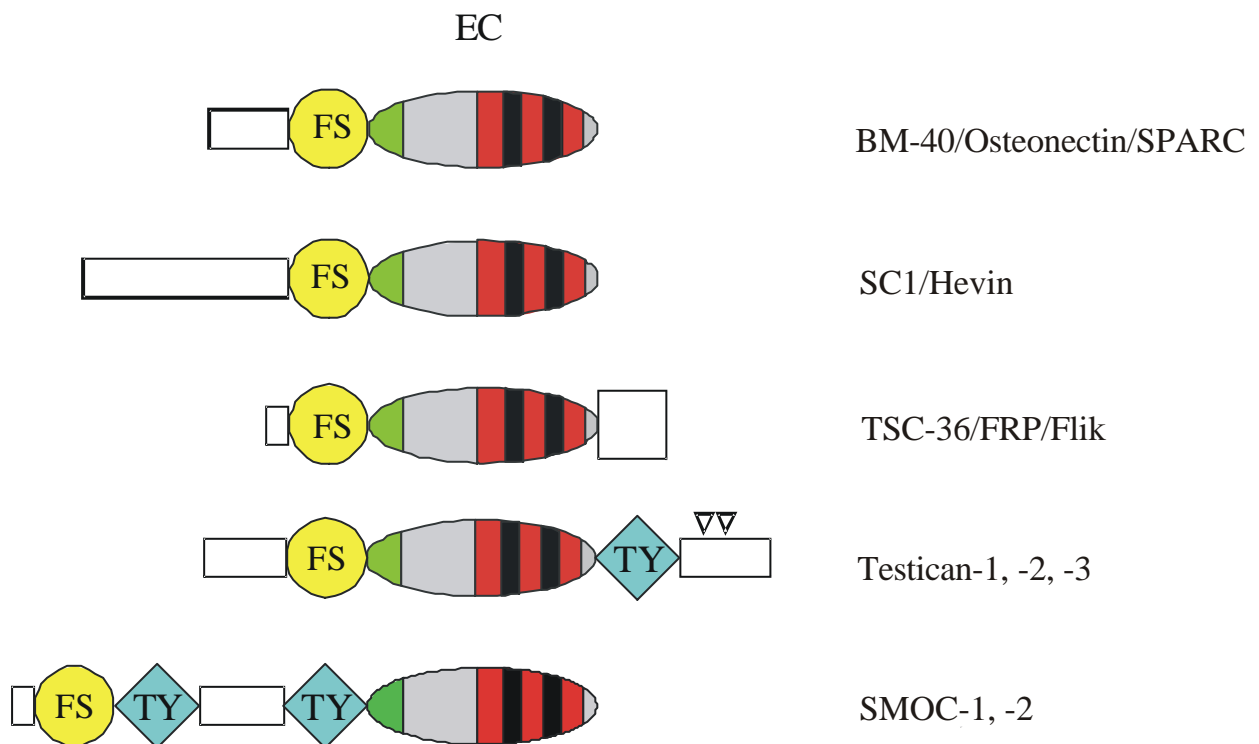
BM-40 wird von vielen verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und glatten Muskelzellen sekretiert (Reed and Sage, 1996). Humane Blutplättchen setzen BM-40 nach Stimulierung mit Thrombin frei (Stenner et al., 1986). Das Protein wird zusätzlich in vielen Geweben insbesondere während der Embryonalentwicklung, Morphogenese und Wundheilung exprimiert (Reed and Sage, 1996). Es wird vermutet, daß BM-40 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen moduliert (Lane and Sage, 1994).

Die Expression von BM-40 während der Entwicklung ist zeitlich und örtlich reguliert. Während der frühen Embryonalentwicklung von Mäusen wird das Protein in der Herzanlage sowie in extraembryonalen Membranen detektiert. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wird BM-40 von vielen verschiedenen Geweben wie Knochen, Knorpel, Herz, Lunge, Thymus, Haut, Gehirn, Darm und Blutgefäßen exprimiert. In adulten Mäusen findet man keine Expression mehr in Herz, Lunge und Thymus. Die stärkste Expression wird dann in Knochen beobachtet, sowie in Geweben, in denen Umordnungsprozesse stattfinden (Lane and Sage, 1994; Brekken and Sage, 2000).

BM-40 wurde nicht nur in Säugetieren, Vögeln, Amphibien und Fischen, sondern auch in Insekten und Nematoden gefunden (Brekken and Sage, 2000).

### 2.1.2 Struktur von BM-40

BM-40 wird in allen bislang untersuchten Spezies von einem einzelnen Gen kodiert. Das humane Protein besteht nach Entfernung der Signalsequenz aus 286 Aminosäuren. BM-40 ist aus drei Domänen aufgebaut: einer N-terminalen sauren Domäne I, die keine Homologie zu bekannten Proteinen besitzt, einer Follistatin-ähnlichen Domäne (FS) und einer C-terminalen extrazellulären, calciumbindenden Domäne (EC), welche zwei EF-Hand-Motive aufweist. BM-40 war das erste extrazelluläre Protein, für das ein EF-Hand-Motiv vorhergesagt wurde (Engel et al., 1987). Inzwischen wurden weitere Proteine gefunden, die ebenfalls eine Kombination von FS- und EC-Domäne und Homologie zu BM-40 aufweisen, so daß man von einer Proteinfamilie ausgeht (Abb. 1-1).

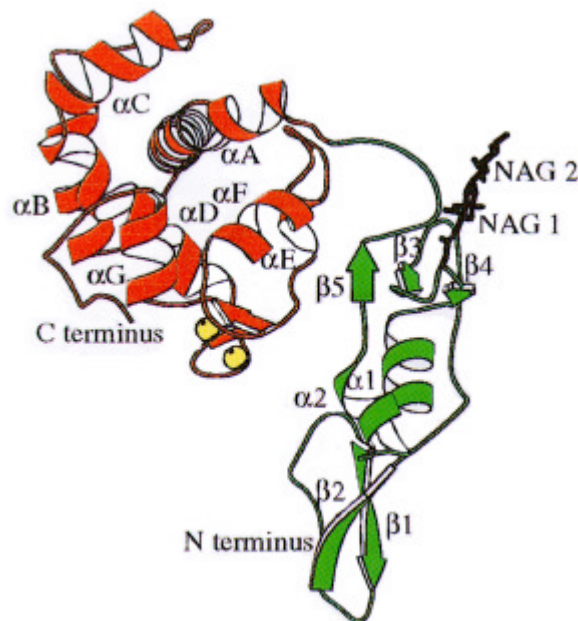


**Abb. 1-1: Mitglieder der BM-40 Proteinfamilie**

Dargestellt ist der Domänenaufbau der bisher bekannten Mitglieder der BM-40-Familie. Alle Proteine besitzen sowohl eine Follistatin-ähnliche Domäne (FS) und eine extrazelluläre, calciumbindende Domäne (EC). TY bezeichnet Thyroglobulin-ähnliche Domänen. Umgekehrte Dreiecke kennzeichnen potentielle Verankerungsstellen für Glykosaminoglykane und offene Rechtecke stellen Domänen ohne Homologie zu bekannten Proteinen dar.

Bei diesen Proteinen handelt es sich um SC1 (Johnston et al., 1990), QR1 (Guermah et al., 1991), TSC-36 (Shibanuma et al., 1993), SMOC-1 und -2 (C. Vannahme, Dissertation) und die Proteoglykane Testican-1, -2 und -3 (Alliel et al., 1993; Vannahme et al., 1999).

Die Aufklärung der Röntgenstruktur der EC-Domäne von BM-40 erbrachte den Beweis für das Vorhandensein eines Motivs aus zwei EF-Händen (Hohenester et al., 1996). Die EC-Domäne weist eine kompakte Struktur mit einem hohen Anteil an  $\alpha$ -Helices auf. Die Röntgenstrukturanalyse des FS-EC-Domänenpaares (Hohenester et al., 1997) zeigt für die Follistatin-ähnliche Domäne einen kleinen hydrophoben Kern, der aus  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen besteht und strukturelle Ähnlichkeit zu den Serin-Protease-Inhibitoren der Kazal-Familie aufweist. Eine Wirkung als Protease-Inhibitor konnte für BM-40 jedoch nicht nachgewiesen werden (Maurer et al., 1992). Die Kristallstruktur des FS-EC-Domänenpaares von BM-40 ist in Abb. 1-2 dargestellt.



**Abb. 1-2: Kristallstruktur des FS-EC-Domänenpaares von BM-40**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des FS-EC-Domänenpaares basierend auf den Daten der Röntgenstrukturanalyse. Die FS-Domäne ist in grün, die EC-Domäne in rot und die gebundenen Calcium-Ionen in Form gelber Kugeln dargestellt. NAG 1 und 2 kennzeichnen die ersten beiden N-Acetylglukosamin-Reste des Oligosaccharids an Asn 99 (aus Hohenester et al., 1997).

### 2.1.3 Posttranslationale Modifizierung

Für BM-40 wurden verschiedene posttranslationale Modifizierungen beobachtet. Schon in der ursprünglichen Studie von Termine et al. (1981) wurde das Protein als phosphoryliertes Glykoprotein beschrieben.

Die Aufklärung der bovinen und humanen cDNA-Sequenz ergab zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen in der FS-Domäne (Abb. 1-2) an Asn 71 und Asn 99 (Bolander et al., 1988; Villareal et al., 1989). Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, daß nur die Glykosylierungsstelle Asn 99 verwendet wird (Xie and Long, 1995; Hohenester et al., 1997). Insbesondere diese ist innerhalb verschiedener Spezies konserviert, häufig mit der Sequenz Asn-Lys-Thr gefolgt von Phe oder Tyr, z.B. in Huhn (Bassuk et al., 1993), Kaninchen (Bluteau et al., 2000), Maus (Mason et al., 1986; Lankat-Buttgereit et al., 1988) und Krallenfrosch (Damjanovski et al., 1992). Eine potentielle N-Glykosylierungsstelle an ähnlicher Position, jedoch mit anderer Sequenz findet man in BM-40 aus Regenbogenforelle (Tang and McKeown, 1995) und Garnele (Tanaka et al., 1998, 2001). Die zweite Glykosylierungsstelle an Position 71 findet man außer in humanem und bovinem BM-40 ebenfalls in BM-40 aus Kaninchen und Huhn. BM-40 aus Nematoden (*Caenorhabditis elegans*, Schwarzbauer and Spencer, 1993) besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen: an Position 80 (Asn-Gln-Thr) und 227 (Asn-Ile-Ser). Die Untersuchung des N-Glykosylierungstyps von BM-40 aus humanem und bovinem Knochen bzw. aus humanen Blutplättchen zeigte die Existenz unterschiedlich glykosylierter Isoformen des Proteins (Kelm and Mann, 1991). Die Resultate der Studie wiesen auf eine eher komplexe Glykosylierung des Proteins aus humanen Blutplättchen und eine mannose-reiche Glykosylierung von Knochen-BM-40 hin. Für diese beiden Glykoformen wurden Unterschiede in der Affinität zu verschiedenen Kollagenen beobachtet. Während BM-40 aus Knochen im Festphasenimmunoassay eine Bindung an Kollagen I, III und V zeigte, konnte für BM-40 aus Blutplättchen keine signifikante Bindung an diese Kollagene nachgewiesen werden (Kelm and Mann, 1991). Auf dieser Grundlage wurde vorgeschlagen, daß die Glykosylierung von BM-40 die Funktion des Proteins entscheidend beeinflußt. Das in Knochen synthetisierte BM-40 hätte somit die potentielle Fähigkeit in eine extrazelluläre Matrix integriert zu werden und das aus Blutplättchen stammende BM-40 eher nicht.

Über die Phosphorylierung von BM-40 existieren unterschiedliche Aussagen, je nach Herkunft des untersuchten Proteins. Für aus bovinem und humanem Knochen isoliertes bzw. von der

Maus Parietal Endoderm Zelllinie PYS sekretiertes BM-40 konnte eine Phosphorylierung gezeigt werden (Termine et al., 1981; Romberg et al., 1985; Engel et al., 1987; Fisher et al., 1987; Hughes et al., 1987). Dagegen konnte für BM-40, welches von fetalen Calvaria-Zellen aus Schweinen bzw. Ratten sekretiert wird, keine Phosphorylierung des Proteins beobachtet werden (Domenicucci et al., 1988; Nagata et al., 1991).

Weiterhin wurde BM-40 als eines der Hauptsubstrate für Transglutaminase-katalysierte Querverknüpfungen in Knorpel und Knochen, die sehr wahrscheinlich einer Stabilisierung der extrazellulären Matrix dienen, identifiziert (Aeschlimann et al., 1993, 1995 und 1996; Hohenadl et al., 1995). Diese kovalente Modifizierung führte sowohl zur Bildung von BM-40-Oligomeren als auch von Komplexen mit anderen Komponenten (Aeschlimann et al., 1995).

In Gewebe liegt BM-40 in einer proteolytisch prozessierten Form vor. Die proteolytische Spaltung an einer einzelnen Spaltstelle innerhalb der  $\alpha$ -Helix C in der EC-Domäne durch eine unbekannte Protease wurde ursprünglich für BM-40 isoliert aus Maus EHS-Tumor identifiziert (Mann et al., 1987). Durch Stabilisierung über Disulfidbrücken bleiben die proteolytischen Fragmente miteinander verbunden. Diese proteolytische Prozessierung, die durch verschiedene Matrix Metalloproteinasen verursacht wird, führt zu einer deutlichen Steigerung der Affinität von BM-40 an Kollagen (Sasaki et al., 1997). Durch Röntgenstrukturanalyse und gezielte Mutagenese konnte aufgeklärt werden, daß die  $\alpha$ -Helix C (Abb. 1-2) in dem intakten Protein die Kollagenbindungsstelle teilweise verdeckt und eine proteolytische Spaltung dieser Helix die Zugänglichkeit der Bindungsstelle verbessert (Sasaki et al., 1998).

## **2.1.4 Funktionelle Studien**

BM-40 bindet an Hydroxylapatit (Termine et al., 1981) sowie an Kollagene vom Typ I (Termine et al., 1981), Typ II und III (Sage et al., 1989), Typ IV (Mayer et al., 1991) sowie Typ V (Sage et al., 1989). Interessanterweise beobachtet man bei Kollagen I-defizienten Mäusen einen verschlechterten Einbau von BM-40 in die extrazelluläre Matrix (Iruela-Arispe et al., 1996). Die Kollagenbindungsstelle befindet sich in der EC-Domäne und konnte wie bereits erwähnt (2.1.3) durch gezielte Mutagenese und Röntgenstrukturanalyse lokalisiert werden (Sasaki et al., 1998). Fünf Aminosäuren sind essentiell für die Bindung von Kollagen, diese liegen in  $\alpha$ -Helix A und in einer Schleifen-Region, die die beiden EF-Hände miteinander verbindet. Diese

Aminosäurereste formen einen flachen Ring, der im Durchmesser dem einer Kollagen-Tripel-Helix entspricht.

BM-40 interagiert außerdem mit den extrazellulären Matrixproteinen Thrombospondin-1 (Clezzardin et al., 1988) und Vitronectin (Rosenblatt et al., 1997). Thrombospondin-1 ist wie BM-40 in Granula von Blutplättchen enthalten und wird von diesen nach Stimulierung mit Thrombin in Form eines Komplexes mit BM-40 freigesetzt (Clezzardin et al., 1988). Eine Bindung von BM-40 an Vitronectin konnte in Festphasen-Bindungsstudien detektiert werden. Außerdem wurde eine Colokalisation beider Proteine in Blutgefäßwänden verschiedener Gewebe beobachtet (Rosenblatt et al., 1997). Die genaue Bedeutung der Interaktion von BM-40 mit Thrombospondin-1 und Vitronectin ist bisher noch nicht geklärt. Möglicherweise ist das Zusammenspiel dieser Proteine für die Regulation von Zell-Matrix-Interaktionen von Bedeutung.

BM-40 bindet ebenfalls an verschiedene Wachstumsfaktoren und hemmt die zelluläre Antwort auf diese Faktoren. Raines et al. (1992) beschrieben eine Interaktion von BM-40 mit PDGF (platelet derived growth factor). Es konnte eine Bindung von BM-40 an die Isoformen PDGF-AB und -BB, jedoch nicht PDGF-AA detektiert werden. Im Gegensatz dazu beschrieben Göhring et al. (1998) eine vergleichbare Affinität von BM-40 zu allen drei PDGF-Isoformen. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte auf die unterschiedliche Herkunft des verwendeten BM-40, als auch auf den Einsatz unterschiedlicher Bindungs-Assays zurückzuführen sein. In einer bisher nicht veröffentlichten Studie von Motamed et al. (siehe Brekken and Sage, 2000) wurde eine Hemmung der von PDGF-AA, -BB und -AB induzierten Proliferation von humanen glatten Muskelzellen *in vitro* beobachtet. Es wurde ebenfalls eine Bindung von BM-40 an VEGF (vascular endothelial growth factor) sowie eine Hemmung der VEGF-induzierten Proliferation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen beschrieben (Kupprion et al., 1998). Weiterhin hemmt BM-40 die durch bFGF (basic fibroblast growth factor) induzierte Proliferation von bovinen Aorta-Endothelzellen (Hasselaar and Sage, 1992). Eine direkte Interaktion zwischen BM-40 und bFGF konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Eine erstaunliche Anzahl an Effekten von BM-40 auf Zellen *in vitro* wurde beschrieben. Eine Veränderung der Zellmorphologie (Sage et al., 1989; Lane and Sage, 1990), Zerstörung von Fokal-Kontakten von Zellen (Murphy-Ullrich et al., 1995), Unterbrechung des Zell-Zyklus (Funk and Sage, 1991; 1993) und eine Regulation der Zelldifferenzierung (Bassuk et al., 1999) sowie der Expression verschiedener Matrix-Metalloproteinasen wurde durch BM-40 vermittelt (Hasselaar et al., 1991; Tremble et al., 1993). Aufgrund der potentiellen Wirkung von BM-40 auf

Adhäsion, Morphologie, Differenzierung und Proliferation wurde die Existenz eines BM-40-Rezeptors vermutet. Ein solcher Rezeptor konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine andere Möglichkeit wäre, daß diese Effekte von BM-40 durch Regulation der Aktivität von Wachstumsfaktoren vermittelt werden.

Die beschriebenen Effekte wurden im allgemeinen durch Zugabe von exogenem BM-40, welches aus dem Überstand von Maus PYS(parietal yolk sac)-Zellen isoliert wurde, bzw. durch Zugabe von synthetischen Peptiden, die von BM-40 abgeleitet wurden, hervorgerufen. Die Interpretation der Ergebnisse wird erschwert durch das Vorhandensein von endogenem BM-40 in vielen Zelltypen. Interessant ist, daß für primäre mesenchymale Zellen, die aus BM-40-defizienten Mäusen isoliert wurden, eine höhere Proliferationsrate und eine veränderte Morphologie im Vergleich zu primären Zellen aus Wildtyp-Mäusen beobachtet wurde (Bradshaw et al., 1999).

In verschiedenen Untersuchungen konnte außerdem beobachtet werden, daß BM-40 eine Rolle während der Tumorgenese spielt. Die Expression des Proteins ist in verschiedenen Tumoren erhöht (Porter et al., 1995; Bellahcene and Castronovo, 1995; Ledda et al., 1997) und steigert die Invasivität von Brust- und Prostata-Tumoren (Jacob et al., 1999) sowie Melanomzellen (Ledda et al., 1997). Im Gegensatz dazu zeigt BM-40 in Ovarialtumoren eine verringerte Expression sowie eine tumorsuppressive Wirkung (Mok et al., 1996).

Mäuse, deren BM-40-Gen deletiert wurde, sind lebensfähig und fertil, d.h. BM-40 ist nicht essentiell für die Embryogenese. Es kommt jedoch zur Bildung von Katarakten in den Augen und einer Zerstörung der Linse (Gilmour et al., 1998; Norose et al., 1998). Die Mäuse entwickeln Osteopenie und weisen eine verringerte Knochenneubildung (Delany et al., 2000) sowie eine verschlechterte Fähigkeit zur Wundheilung (Basu et al., 2001) auf. Diese Beobachtungen stützen die These, daß BM-40 eine Rolle für die Organisation der extrazellulären Matrix, insbesondere der Knochenmatrix, und während der Wundheilung spielt.

## **2.2 Glykosylierung von Proteinen**

Die Kohlenhydratketten von Glykoproteinen können in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: O-glykosidisch bzw. N-glykosidisch verknüpfte Glykane. O-glykosidisch verknüpfte Glykane vom Mucin-Typ sind generell über ein N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) mit der

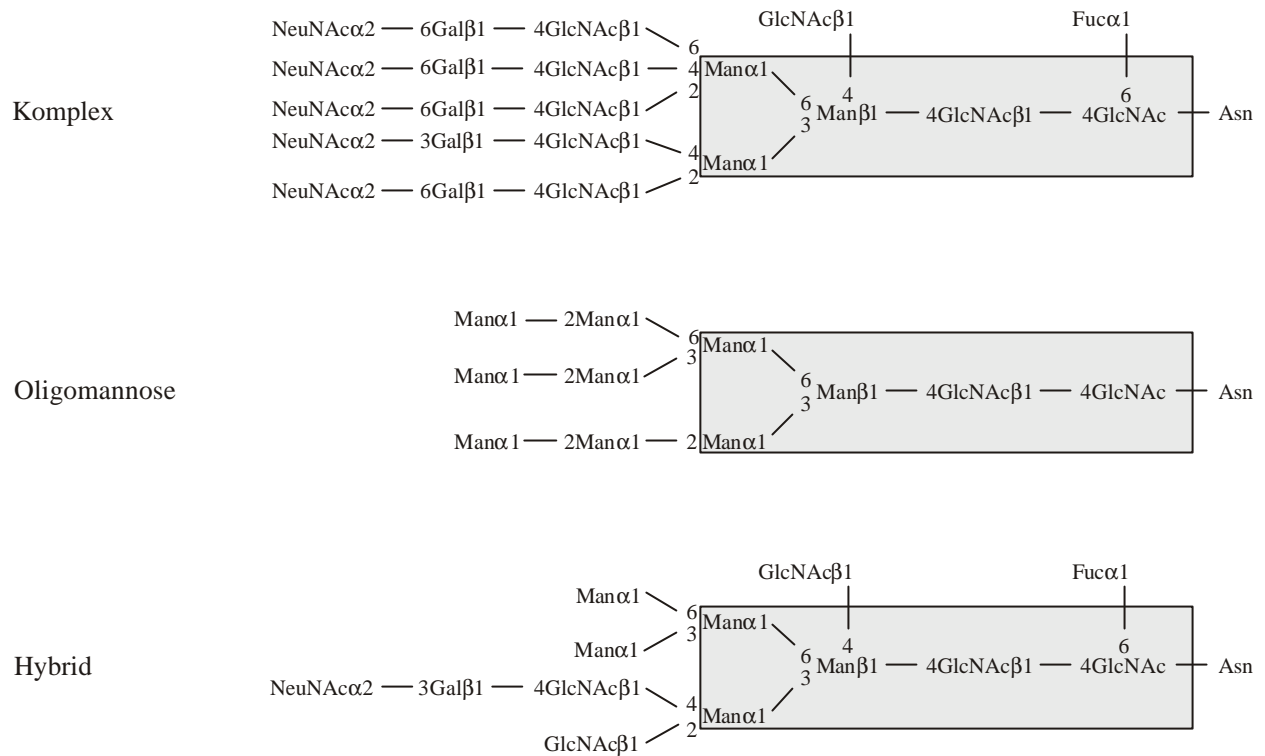
Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin verbunden. Daneben gibt es weitere O-glykosidisch gebundene Glykane, beispielsweise als Bestandteil von Proteoglykanen, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. N-Glykane sind über N-Acetylglukosamin (GlcNAc) mit der Amidgruppe von Asparagin verknüpft. Die für eine N-Glykosylierungsstelle notwendige Konsensussequenz lautet Asn-Xxx-Ser/Thr, wobei Xxx eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin oder Asparaginsäure sein kann (Marshall, 1972). Für O-Glykosylierungen ist keine spezielle Konsensussequenz bekannt (Gooley et al., 1994; Nehrke et al., 1996). Gewöhnlich tragen Glykoproteine an einer spezifischen Glykosylierungsstelle unterschiedliche Glykan-Strukturen, dies bezeichnet man mit Mikroheterogenität. Grundsätzlich ist die Protein-Glykosylierung spezies-, gewebe-, zelltyp-, entwicklungs- und proteinspezifisch.

### 2.2.1 Strukturelle Eigenschaften

Alle N-Glykane teilen eine gemeinsame Pentasaccharid-Struktur (core-Struktur, Trimannosyl-core). Ausgehend davon, welche weiteren Saccharid-Gruppen an diese core-Struktur gebunden sind, unterscheidet man drei verschiedene Typen der N-Glykosylierung (Abb. 1-3).

Komplexe N-Glykane enthalten keine weiteren Mannose-Reste außerhalb der core-Struktur. Bis zu fünf Antennen können jeweils über ein GlcNAc mit den beiden  $\alpha$ -Mannosylresten der core-Struktur verbunden sein. Weitere strukturelle Vielfalt entsteht durch das potentielle Vorhandensein einer  $\alpha$ -1,6-gebundenen Fucose (core-Fucose) am proximalen GlcNAc sowie eines in C-4-Position am zentralen Mannose-Rest gebundenen GlcNAc, was zu einem GlcNAc- $\beta$ -1,4-geteilten („bisecting“) Glykan führt. N-Glykane vom Oligomannose-Typ enthalten nur Mannose-Reste außerhalb der Pentasaccharid-Grundstruktur. N-Glykane vom Hybrid-Typ besitzen Eigenschaften der beiden anderen N-Glykan-Typen: ein bis zwei Mannose-Reste sind mit dem  $\alpha$ -1,6-gebundenen Mannose-Rest der core-Struktur verknüpft, während komplexe Ketten mit dem  $\alpha$ -1,3-gebundenen Mannose-Rest der core-Struktur verbunden sind (Kornfeld and Kornfeld, 1985).





**Abb. 1-3: N-Glykosylierungs-Typen**

Aufgeführt sind die drei verschiedenen Grundtypen der NGlykosylierung. Die Struktur innerhalb des grauen Kastens beschreibt die allen N-Glykanen gemeinsame Pentasaccharid-Struktur (core). Außerhalb des grau unterlegten Bereichs sind die Strukturen variabel. (Fuc = Fukose, Gal = Galaktose, GlcNAc = N-Acetylglukosamin, Man = Mannose, NeuNAc = N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure))

O-Glykane besitzen weniger strukturelle Regeln als N-Glykane. Sie teilen keine gemeinsame Grundstruktur, sondern können nach bisherigen Erkenntnissen in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt werden, basierend auf sechs verschiedenen core-Strukturen (Schachter and Brockhausen, 1992).

## 2.2.2 Biosynthese

Die Biosynthese der N-Glykane (Snider, 1984; Kornfeld and Kornfeld, 1985) beginnt im rauen endoplasmatischen Retikulum mit der Synthese einer Oligosaccharid-Vorstufe ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ), die über Pyrophosphat an das membranständige Lipid Dolichol gebunden ist. Diese Oligosaccharid-Vorstufe wird auf einen Asparagin-Rest der wachsenden Polypeptidkette übertragen. Anschließend folgt die Abspaltung der drei terminalen Glukose-Reste durch zwei  $\alpha$ -Glukosidasen und eines Mannose-Restes durch eine spezifische

$\alpha$ -Mannosidase. Die weitere Prozessierung findet im Golgiapparat statt. Im cis-Golgikompartiment werden alle  $\alpha$ 1-2 verknüpften Mannose-Reste durch eine spezifische Mannosidase entfernt. N-Glykane vom Oligomannose-Typ verlassen in diesem frühen Stadium den Biosyntheseweg. Im mittleren Golgikompartiment erfolgt die Übertragung von N-Acetylglukosaminresten auf das Glykan sowie die Abspaltung der restlichen zwei Mannose-Reste, die außerhalb der core-Struktur gebunden sind. Hybrid-Typ N-Glykane entstehen als Zwischenprodukte zu diesem Zeitpunkt des Biosyntheseweges. Die Verlängerung der Antennen mit Hilfe spezifischer Glykosyltransferasen von komplexen N-Glykanen findet im trans-Golgi statt.

Bei der Biosynthese der O-Glykane wird zuerst ein N-Acetylgalaktosamin auf die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin übertragen. Dieses bildet den Ausgangspunkt für die Entstehung der verschiedenen core-Strukturen, welche zu linearen oder verzweigten Oligosaccharidketten verlängert werden können (Schachter and Brockhausen, 1992).

### **2.2.3 Biologische Rolle der Glykosylierung von Proteinen**

Die Bedeutung, die die Glykosylierung eines bestimmten Proteins hat, läßt sich kaum vorhersagen. Auch die Auswirkungen, die die Veränderung der Glykosylierung eines Proteins auf dessen funktionelle Eigenschaften hat, lassen sich im allgemeinen nicht abschätzen. Es sind sowohl keine als auch schwerwiegende Auswirkungen möglich.

Grundsätzlich werden sehr viele verschiedene biologische Funktionen der Proteinglykosylierung beschrieben von denen einige hier genannt werden (Varki, 1993). Oligosaccharide können eine schützende oder maskierende Funktion ausüben, indem sie eine Erkennung des Proteins durch Proteasen, Mikroorganismen und Antikörper verhindern. Im Gegensatz dazu können sie jedoch auch als Rezeptor für Viren, Bakterien, Parasiten, pflanzliche und bakterielle Toxine sowie als Antigen für Autoimmun- und Alloimmunreaktionen dienen.

In vielen Fällen spielen Glykosylierungen eine strukturelle und stabilisierende Rolle, indem sie die korrekte Polypeptid-Faltung im rauen endoplasmatischen Retikulum unterstützen und die Konformation eines Proteins erhalten. Nicht korrekt glykosylierte Proteine werden häufig falsch gefaltet, verlassen das ER nicht und werden degradiert.

Weiterhin kann die Glykosylierung eines Proteins die Interaktion mit Liganden oder Rezeptoren modulieren. Beispielsweise existiert das Cytokin GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) in verschiedenen Glykoformen, die Unterschiede in Bindungsaffinitäten und Signaltransduktion aufweisen (Cebon et al., 1990).

Kohlenhydratketten spielen auch eine Rolle in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Erkennung. Als Beispiel kann hierbei die Selektin-Familie von Rezeptorproteinen dienen, die die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen (L-Selektin), die Erkennung von Leukozyten durch stimuliertes oder geschädigtes Endothel (E-Selektin) und die Interaktion von aktivierten Blutplättchen oder Endothel mit Leukozyten (P-Selektin) vermittelt. Jedes Selektin interagiert mit seinen Liganden über eine Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD) in einer calcium-abhängigen Weise (Varki, 1992; Ebnet and Vestweber, 1999).

Die Glykosylierung von Proteinen kann in pathologischen Prozessen verändert sein. Beispielsweise exprimieren Tumorzellen häufig Proteine mit veränderten Glykosylierungsmustern. Aus diesem Grund werden geeignete Kohlenhydrate als Tumormarker verwendet (Muramatsu, 1993). Ein weiteres Beispiel für pathologisch veränderte Glykosylierungsmuster findet man bei Rheumatoider Arthritis und Tuberkulose, die beide mit einem Mangel an terminalen Galaktose-Resten auf den Oligosacchariden am F<sub>C</sub>-Teil von Serum-IgG-Molekülen assoziiert sind (Rook et al., 1989; Furukawa and Kobata, 1991).

## 2.3 Aufbau und Stoffwechsel des Knochens

Der Knochen besteht aus einer organischen Matrix, die durch eine calciumhaltige Mineralphase verstärkt und mechanisch stabilisiert wird. Bei diesen anorganischen Bestandteilen handelt es sich in erster Linie um Hydroxylapatit  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Daneben findet man Fluorapatit, Carbonatapatit, Calciumcarbonat und Magnesiumcarbonat.

Die organischen Bestandteile machen etwa 40 % der Trockenmasse des Knochens aus und setzen sich aus der Matrix (98 %) und zellulären Bestandteilen (2 %) zusammen. Die Matrix besteht zu 90 % aus Kollagen Typ I und zu 10 % aus nicht-kollagenen Proteinen wie Osteocalcin, BM-40, Bone Sialoprotein (BSP) sowie Proteoglykanen.

Nach der Art der Anordnung der Kollagenfibrillen unterscheidet man Geflechtknochen und Lamellenknochen. Im Geflechtknochen, der vor allem während der Knochenentwicklung und Knochenbruchheilung vorkommt, verlaufen die Kollagenfasern ohne besondere Orientierung zu

den ernährenden Gefäßen. Während der weiteren Entwicklung wird der Geflechtknochen im allgemeinen durch den höher strukturierten Lamellenknochen ersetzt.

Der Lamellenknochen besteht aus verschiedenen Schichten helikal verlaufender, parallel angeordneter Kollagenfaserbündel.

Von außen ist der Knochen von einer Knochenhaut (Periost) umgeben. An diese schließt sich die Kompakta oder Kortikalis an, die aus spindelförmigen Einheiten besteht, in deren Inneren sich ein Zentralkanal oder Haversscher Kanal befindet. Dieser enthält Blutgefäße, Nerven und lockeres Bindegewebe. Versorgt werden die Blutgefäße der Zentralkanäle durch quergerichtete, vom Periost ausgehende Versorgungskanäle (Volkmann-Kanäle). Die Kortikalis geht in die Spongiosa über, die aus einem Netzwerk feiner Knochenbälkchen besteht, in dessen Maschen sich Knochenmark befindet.

Die Entstehung von Knochengewebe beruht auf zwei verschiedenen Mechanismen: der direkten oder desmalen Ossifikation und der chondralen Ossifikation.

Bei der desmalen Ossifikation wird die mineralisierte Knochenmatrix auf der Grundlage von mesenchymalem Bindegewebe gebildet (z.B. Schädelknochen). Mesenchymzellen differenzieren zu Osteoblasten (Knochenbildungszellen), die das Osteoid, eine unverkalkte Perizellulärmatrix, ausscheiden. Diese verkalkt zunehmend durch Einlagerung von Hydroxylapatit. Die Osteoblasten werden schrittweise in die mineralisierte Matrix eingelagert und entwickeln sich zu Osteozyten, die über lange Zytoplasmafortsätze miteinander in Verbindung stehen.

Bei der chondralen Ossifikation (z.B. Röhrenknochen) entsteht aus dem Mesenchym Knorpel, der schrittweise abgebaut und durch Knochenmatrix ersetzt wird.

Der adulte Knochen unterliegt einem ständigen Umbau, um alte oder brüchige Knochensubstanz zu erneuern. Dazu muß zunächst die alte Knochenmatrix abgebaut werden. Der Abbau der Knochenmatrix erfolgt durch Osteoklasten, mehrkernige Riesenzellen mesenchymalem Ursprungs mit einem Mikrovillisaum. Diese weisen eine Abbauleistung auf, die der Aufbauleistung von etwa 100 Osteoblasten entspricht. Zunächst werden durch mechanischen Stress, Parathormon oder 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Osteoblasten aktiviert. Diese sekretieren Proteine, an die Osteoklasten binden können. Die Osteoklasten orientieren sich mit ihrem Mikrovillisaum, der durch eine Protonenpumpe ein Absinken des pH-Werts und demzufolge eine Auflösung der Hydroxylapatitkristalle verursacht, in Richtung der Knochenmatrix. Zusätzlich sekretieren die Zellen lysosomale Enzyme, Kollagenasen und Proteasen, die die organische Knochenmatrix abbauen. Vor dem Verlassen der so entstandenen Resorptionslakune

sekretieren die Osteoklasten Wachstumsfaktoren, Prostaglandine, Interleukine und Cytokine, die Osteoblasten aktivieren. Diese synthetisieren neue Knochenmatrix und füllen die Resorptions-lakune wieder auf. (Horton, 1993 ; Schenk et al., 1993 ; Woitge et al., 1993 ; Lerner, 2000)

Das Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der Knochenmatrix wird also durch die Regulation der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten bestimmt, welche das biologisch aktive Kompartiment des Knochens darstellen. In der klinisch-chemischen Diagnostik kann eine Störung des Knochenstoffwechsels durch unterschiedliche biochemische Marker erfolgen, die Auf- und Abbauprozesse des Knochens erfassen. Diese Marker kann man zwei Gruppen zuordnen: auf der einen Seite Parameter der enzymatischen Aktivität von Osteoblasten bzw. Osteoklasten, auf der anderen Seite Matrixbestandteile, die beim Aufbau bzw. Abbau der Knochenmatrix freigesetzt werden.

Verschiedene Marker für die Bildung von Knochen finden derzeit eine klinische Anwendung. Diese werden im Serum ermittelt.

Der Serumspiegel an Alkalischer Phosphatase setzt sich normalerweise zu gleichen Teilen aus der leber- bzw. knochenspezifischen Isoform des Enzyms zusammen. Die knochenspezifische Isoform der Alkalischen Phosphatase wird in verschiedenen Assays nachgewiesen. Jedoch auch neuere Immunoassays haben den Nachteil einer bis zu 20 %igen Kreuzreaktivität mit dem aus Leber stammenden Isoenzym. Die Verwendung dieses Markers setzt daher voraus, daß keine Störung der Leberfunktion vorliegt.

Osteocalcin, welches etwa 15 % der nicht-kollagenen Proteine in der Knochenmatrix ausmacht, wird als spezifischer Marker der Osteoblastenfunktion angesehen. Es wird vermutet, daß etwa 20 % des neu synthetisierten Proteins direkt in die Blutzirkulation freigesetzt wird, wo es spezifisch immunoquantitativ nachweisbar ist. Der Nachteil dieses Markers ist eine rasche Degradation des Proteins, so daß die Immunoreaktivität in Serumproben schnell nachläßt. Weiterhin werden auch durch die Resorption der Knochenmatrix Osteocalcin-Fragmente freigesetzt. Insgesamt ergibt sich somit eine starke Heterogenität der im Serum nachweisbaren Epitope.

Kollagen I macht den größten Teil der in Knochen vorkommenden Proteine aus. Es wird in Form eines Vorläufermoleküls synthetisiert, welches globuläre Extensionspeptide enthält, die als N-terminales (PINP) bzw. C-terminales (PICP) Propeptid bezeichnet werden. Diese werden enzymatisch abgespalten und ins Blut freigesetzt. Diese von Kollagen I abgeleiteten Propeptide können ebenfalls aus anderen Quellen, beispielsweise Haut, stammen. Da diese jedoch einen

geringere Stoffwechselrate als Knochen besitzen, ist dieser Beitrag zum Serumspiegel der beiden Propeptide wahrscheinlich eher gering. Der Vorteil dieser beiden Marker ist ihre Thermostabilität. Die klinische Relevanz in der Bestimmung von Knochenstoffwechselerkrankungen ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. (Seibel, 2000)

Die meisten Marker für die Resorption von Knochen werden in Urin bestimmt, neuere Testsysteme verwenden auch Serum.

Hydroxylysin-Glykoside werden während der posttranslationalen Modifizierung von Kollagen gebildet und beim Kollagenabbau freigesetzt. Zwei verschiedene Hydroxylysin-Glykoside treten auf: Glukosyl-Galaktosyl-Hydroxylysin (Glc-Gal-Hyl) und Galaktosyl-Hydroxylysin (Gal-Hyl). Beide können im Urin nach Derivatisierung mittels HPLC bestimmt werden. Insbesondere Gal-Hyl ist knochenspezifisch. Der größte Nachteil dieser Marker ist der Mangel an Immunoassays.

Hydroxypyridinium-Quervernetzungen („crosslinks“) werden während der extrazellulären Reifung von Kollagen gebildet. Die 3-(OH)-Pyridinium-Derivate Pyridinolin (PYD) und Deoxypyridinolin (DPD) werden während der Knochenresorption in Blut und Urin freigesetzt. Ursprünglich wurden diese Crosslink-Komponenten anhand ihrer natürlichen Fluoreszenz mittels HPLC im Urin nachgewiesen. Inzwischen wurden spezifische Immunoassays entwickelt. DPD und PYD werden momentan als die besten Marker zur Bestimmung der Knochenresorptionsrate angesehen. Insbesondere DPD kommt hauptsächlich in Knochen vor.

Die Quervernetzung von Kollagenen bezieht stets die N-terminalen bzw. C-terminalen Telopeptide ein. Diese Kollagen I Crosslink-Telopeptide werden ebenfalls während des Abbaus der Knochenmatrix in Urin und Blut freigesetzt. Sie können jedoch auch von allen anderen Kollagen I enthaltenden Geweben freigesetzt werden, allerdings geht man aufgrund der höheren Stoffwechselrate in Knochen davon aus, daß der Serum- und Urinspiegel hauptsächlich auf die Resorption von Knochen zurückzuführen ist.

Bone Sialoprotein (BSP) ist ein phosphoryliertes Glykoprotein, welches etwa 10 % der nicht-kollagenen Proteine im Knochen ausmacht. Das Protein kommt in Knochen, Knorpel und Dentin vor. Verschiedene Immunoassays zur Bestimmung des BSP-Spiegels in Serum wurden in der letzten Zeit entwickelt. Auf der Basis der klinischen Daten wird vermutet, daß der Serum-BSP-Spiegel mit der Knochenabbaurate korreliert. Der Serum-BSP-Spiegel ist ebenfalls für die Prognose der Knochenmetastasierung beim Mammakarzinom klinisch relevant (Diel et al., 1999; Seibel, 2000).

## 2.4 Zielsetzung

Wie in Abschnitt 2.1.3 erwähnt existiert BM-40 soweit bisher bekannt in zwei verschiedenen Isoformen: einer komplex glykosylierten Isoform, welche von humanen Blutplättchen sekretiert wird, und einer eher mannose-reichen Isoform, die aus humanem Knochen isoliert wurde. Unterschiede in der Bindung zu Kollagen weisen auf nicht-identische Funktionen der Isoformen hin (Kelm and Mann, 1991).

Die strukturellen Unterschiede der beiden Glykoformen könnte man sich für die Diagnostik zu Nutze machen, um die Herkunft von BM-40 in Patientblutproben zu bestimmen. Auf diese Weise könnte BM-40 als Marker für Knochenstoffwechselerkrankungen verwendet werden, indem man ausgehend von den Unterschieden im Glykosylierungsmuster gezielt eine durch einen gestörten Knochenstoffwechsel ausgelöste Erhöhung von Knochen-BM-40 im Blut nachweist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Voraussetzungen geschaffen werden, die funktionelle Bedeutung der Glykosylierung von BM-40 zu untersuchen und ein solches diagnostisches Testsystem aufzubauen. Dazu sollten die verschiedenen BM-40-Isoformen rekombinant exprimiert und aus Gewebe gereinigt werden. Die gereinigten Proteine sollten insbesondere durch eine detaillierte N-Glykan-Analyse charakterisiert und verglichen werden. Mit Hilfe der rekombinant hergestellten unterschiedlich glykosylierten Varianten könnte dann in zukünftigen Experimenten sowohl das angesprochene diagnostische Testsystem mit BM-40 als Marker für Knochenstoffwechselerkrankungen aufgebaut werden, als auch eine Untersuchung funktioneller Unterschiede erfolgen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte in einem Zellkulturmodell für mineralisierte Matrix mit Hilfe von Immunfluoreszenzuntersuchungen sowie Zell- und Matrixextraktionen die Lokalisation von BM-40 in der Perizellulärmatrix untersucht werden.

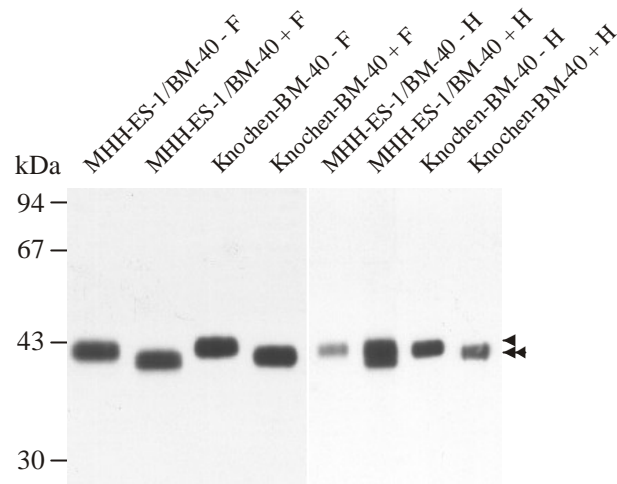
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung des N-Glykosylierungstyps verschiedener Zelllinien

Die unterschiedlich glykosylierten BM-40-Varianten aus Blutplättchen und Knochen sollten rekombinant exprimiert werden. Da von der humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK) 293 bereits die Sekretion von BM-40 mit einem komplexen N-Glykosylierungstyp bekannt war (Nischt et al. 1991, sowie eigene Daten), sollte diese Zelllinie zur Herstellung von rekombinatem blutplättchen-ähnlichem BM-40 verwendet werden. Gleichzeitig wurde nach einer Zelllinie gesucht, die eine knochen-ähnliche N-Glykosylierung von BM-40 aufwies. Es wurden hauptsächlich Osteosarkomzelllinien getestet sowie die Maus-Zelllinie MN7, die in der Literatur als osteoblasten-ähnlich beschrieben wurde.

Verschiedene Zelllinien wurden in Kultur genommen und nach einigen Passagen serumfrei gesetzt. Jeweils 1 ml serumfreier Überstand wurde TCA-gefällt, in geeigneten Puffern aufgenommen und mit N-Glykosidase F und mit Endoglykosidase H über Nacht inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, und BM-40 wurde mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers gegen rekombinant hergestelltes humanes BM-40 bzw. im Fall von Maus- oder Rattenzelllinien mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers gegen Maus-BM-40 nachgewiesen. N-Glykosidase F schneidet unspezifisch alle N-Glykane, während nur N-Glykane vom Oligomannose- oder vom Hybrid-Typ Endoglykosidase-H sensitiv sind. Eine positive Reaktion wurde durch ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel nachgewiesen.





**Abb. 3-1: Glykosylierungsanalyse von BM-40 aus humanem Knochen und MHH-ES-1-Zellen**

Immunoblot mit polyklonalem  $\alpha$ -human-BM-40 Antikörper

1 ml serumfreier Überstand von MHH-ES-1-Zellen wurde mit TCA gefällt. Die Umsetzung mit 1 U N-Glykosidase F (F) erfolgte in TBS, pH 7.4, und mit 5 mU Endoglykosidase H (H) in 100 mM Natriumacetat, pH 5.8, über Nacht bei 37°C. Die Proben wurden reduziert und über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Pfeilspitze markiert unverdautes BM-40, die doppelte Pfeilspitze deglykosyliertes BM-40. Auf der linken Seite ist die Laufhöhe der Markerproteine in kDa angegeben.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3-1 und Tab. 3-1 dargestellt. Die Daten für BM-40 aus Knochen und Blutplättchen sind aus der Literatur bekannt (Kelm and Mann, 1991) und konnten in eigenen Experimenten bestätigt werden. Es zeigte sich, daß von den getesteten, osteoblastenähnlichen Zelllinien lediglich die humane Osteosarkomzelllinie MHH-ES-1 BM-40 exprimiert, das zumindest teilweise Endoglykosidase H-sensitiv ist und daher eine knochen-ähnliche mannose-reiche Glykosylierung trägt. Alle anderen getesteten Zelllinien wiesen eine Komplex-Typ Glykosylierung auf.

**Tabelle 3-1: BM-40 Glykoformen in Gewebe und verschiedenen osteoblastenähnlichen Zelllinien**

Verschiedene osteoblastenähnliche Zelllinien wurden hinsichtlich ihres N-Glykosylierungstyps von BM-40 durch Verdau mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H untersucht. Eine positive Reaktion wurde durch ein verändertes Laufverhalten im SDS-Polyacrylamid-Gel angezeigt (für Beispiel siehe Abb. 31). Getestet wurde serumfreier Überstand von Wildtyp-Zellen bzw. aus Knochen und Blutplättchen isoliertes BM-40.

	Herkunft des Gewebes bzw. der Zelllinie	Verdauung mit N-Glykosidase F	Verdauung mit Endo H	N-Glykosylierungstyp
<b>Knochen</b>	human	+	+	<b>mannose-reich</b>
Blutplättchen	human	+	-	komplex
SaOS-2	Osteosarkom, human	+	-	komplex
MG-63	Osteosarkom, human	+	-	komplex
U2-OS	Osteosarkom, human	+	-	komplex
HOS	Osteosarkom, human	+	-	komplex
UMR-108	Osteosarkom, Ratte	+	-	komplex
MN7	Knochenmark, Maus	+	-	komplex
<b>MHH-ES-1</b>	Osteosarkom, human	+	+/-	<b>gemischt</b>

## 3.2 Rekombinante Expression von humanem BM-40

Zur rekombinanten Herstellung von BM-40 wurden eukaryotische Expressionssysteme verwendet, bestehend aus humanen Zelllinien sowie entsprechenden Expressionsvektoren. Dies soll korrekte posttranslationale Modifikationen sowie eine möglichst native Konformation der rekombinanten Proteine im Vergleich zu aus Gewebe isoliertem BM-40 gewährleisten.

### 3.2.1 Klonierung

Zu Beginn der Arbeit lagen bereits zwei BM-40-Konstrukte (Nischt et al., 1991) vor, die von Dr. Roswitha Nischt (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt wurden. Das Konstrukt huBM-40blue enthält die vollständige humane BM-40-cDNA im Blueskript KS (+)- Vektor. Das Konstrukt pRc/BM-40 beinhaltet die vollständige humane BM-40-cDNA im eukaryotischen Expressionsvektor pRcCMV, welcher eine stabile Integration in das Genom der Zellen ermöglicht. Zusätzlich wurden zwei

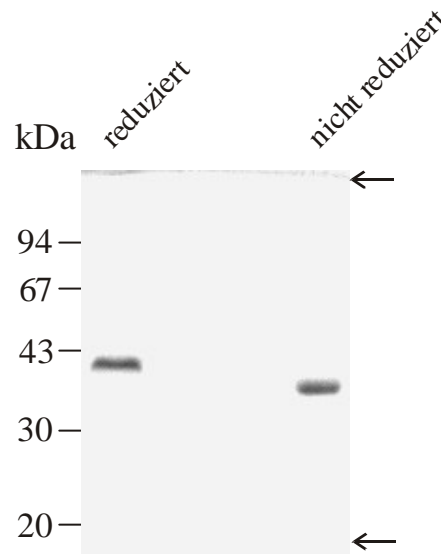
verschiedene Vektorkonstrukte basierend auf dem episomalen eukaryotischen Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997) generiert. Zur Herstellung des Konstrukts pCEP-Pu/BM-40 wurde die humane BM-40 cDNA inklusive Signalpeptid über Not I und Xho I aus dem huBM-40blue-Vektor in den pCEP-Pu-Vektor eingesetzt. Weiterhin wurde das Konstrukt SP-his6-myc-fX-BM-40-pCEP-Pu hergestellt, welches für ein Fusionsprotein kodiert, das N-terminal der BM-40-Sequenz eine His6-Sequenz (zur Erleichterung der Aufreinigung mittels Affinitäts-chromatographie), eine myc-Sequenz und eine Faktor X-Schnittstelle enthält. Um die Sekretion des Fusionsproteins zu gewährleisten, enthält der Vektor ebenfalls das BM-40 Signalpeptid (SP). Über die Faktor X-Schnittstelle kann die N-terminal angehängte Sequenz entfernt werden. Zur Herstellung des Vektors wurde der kodierende Bereich der humanen BM-40-cDNA (ohne Signalpeptid) mittels PCR amplifiziert und in den bereits vorhandenen Vektor SP-his6-myc-fX-pCEP-Pu eingesetzt.

### 3.2.2 Rekombinante Expression von BM-40 in EBNA-293-Zellen

Bereits in früheren Arbeiten (Nischt et al., 1991) wurde die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK) 293 zur rekombinanten Expression von BM-40 verwendet. Aus diesen Arbeiten ist das rekombinante 293-BM-40 bereits gut charakterisiert. Es ist bekannt, daß 293-Zellen nach Transfektion BM-40 mit einem komplexen und damit eher blutplättchen-ähnlichen N-Glykosylierungstyp sekretieren. Zum anderen zeigen die Zellen eine hohe Überexpression von BM-40, welches sich leicht aufreingen läßt. In der vorliegenden Arbeit wurden EBNA-293-Zellen zur Herstellung von rekombinantem humanem BM-40 mit komplexer N-Glykosylierung gewählt. Bei diesen Zellen handelt es sich um HEK-293-Zellen, bei denen ein EBNA-1-Gen (Epstein-Barr Nuclear Antigen) stabil in das Genom integriert wurde. Dieses Gen ist ebenfalls im pCEP-Pu-Vektor vorhanden. Es kodiert für ein virales DNA-bindendes Protein, dessen Bindungsstelle im *oriP*-Bereich des Vektors liegt. Auf diese Weise wird eine episomale Replikation und eine stabile Verteilung auf die proliferierenden Zellen erreicht. Das zusätzliche Vorhandensein des Gens in den EBNA-293-Zellen führt zu einer höheren Expressionsrate (Yates et al., 1985).

Das Konstrukt pCEP-Pu/BM-40 wurde mittels Lipid-vermittelter Transfektion in die Zellen eingeführt. Nach 48 h wurde mit der Selektion mit Puromycin begonnen, welche nach etwa zwei bis drei Wochen abgeschlossen war. Das Vorhandensein des Proteins im serumfreien Überstand wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung überprüft (nicht gezeigt).

Anschließend wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert, wobei alle zwei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Die gesammelten Überstände wurden vereinigt und gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, dialysiert. Das Protein wurde mittels Anionenaustauschchromatographie über eine DEAE-Sepharose-Fast-Flow- sowie eine ResourceQ-Säule bis zur Homogenität gereinigt. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 3-2). Die Ausbeute betrug 10 mg Protein aus einem Liter Überstand.



**Abb. 3-2: Rekombinant exprimiertes BM40 aus Kulturüberständen von EBNA-293-Zellen**

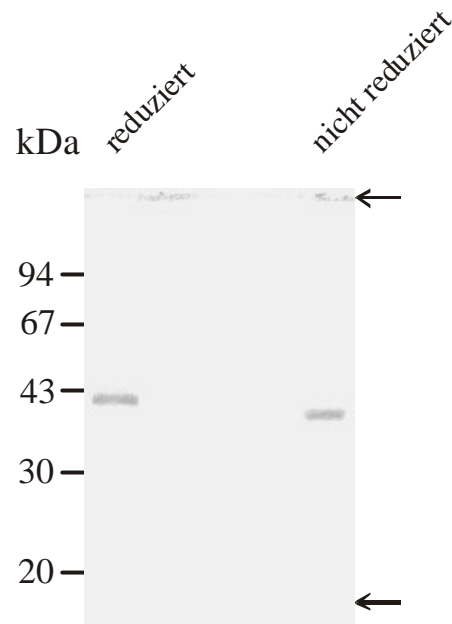
Das gereinigte Protein wurde unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und Coomassiefärbung nachgewiesen. Der obere Pfeil markiert den Beginn des Trenngels, der untere die Höhe der Lauffront. Auf der linken Seite ist die Laufhöhe der Markerproteine in kDa angegeben.

### 3.2.3 Rekombinante Expression von BM-40 in der humanen Osteosarkomzelllinie SaOS-2

SaOS-2-Zellen werden in der Literatur als osteoblasten-ähnliche Zellen beschrieben (McQuillan et al., 1995). Diese Zelllinie exprimiert eine Reihe typischer Osteoblasten-Marker und wird häufig als *in vitro*-Modell für die Untersuchung von Osteoblasten-Funktionen verwendet. Aus diesem Grund erfolgte die rekombinante Expression von BM-40 ebenfalls in dieser Zelllinie, obwohl die Voruntersuchungen gezeigt hatten, daß diese Zelllinie kein knochen-ähnliches BM-40 sekretiert. Da jedoch auch im Rahmen dieser Arbeit ein auf SaOS-2-Zellen beruhendes Modell

einer mineralisierten Knochenmatrix untersucht wurde, ist die Glykosylierung von BM-40 aus dieser Zelllinie durchaus von Interesse.

Die Zellen wurden sowohl stabil mit dem pRc/BM-40-Konstrukt als auch episomal mit dem pCEP-Pu/BM-40-Konstrukt transfiziert. Nach 48 h wurde mit der Selektion begonnen. Im Fall der stabil transfizierten Zellen erfolgte die Selektion mit G418, im Fall der episomal transfizierten Zellen mit Puromycin. Die Selektion war nach etwa zwei bis drei Wochen abgeschlossen. Anschließend wurden im Fall der stabil transfizierten Zellen einzelne Klone isoliert, unter serumfreien Bedingungen kultiviert und die Expression von BM-40 im Immunoblot überprüft. Alle stabil transfizierten Klone wiesen keine oder nur eine geringe Überexpression von BM-40 gegenüber dem Wildtyp auf. Die episomal transfizierten Zellen wurden nach abgeschlossener Selektion ebenfalls unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Die Analyse der serumfreien Überstände ergab in diesem Fall im coomassiegefärbten SDS-Gel eine deutliche Überexpression gegenüber dem Überstand von Wildtyp-Zellen. Die Zellen wurden anschließend expandiert und es wurde 3.5 l serumfreier Überstand gesammelt. Dieser wurde gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, dialysiert und anschließend mittels Anionenaustauschchromatographie über eine DEAE-Sepharose-Fast-Flow- sowie eine ResourceQ-Säule bis zur Homogenität (Abb. 3-3) des Proteins gereinigt. Die Ausbeute nach Reinigung betrug etwa 0.8 mg pro Liter gesammelten Überstandes.



**Abb. 3-3: Rekombinant exprimiertes BM-40 aus Kulturüberständen von SaOS-2-Zellen**

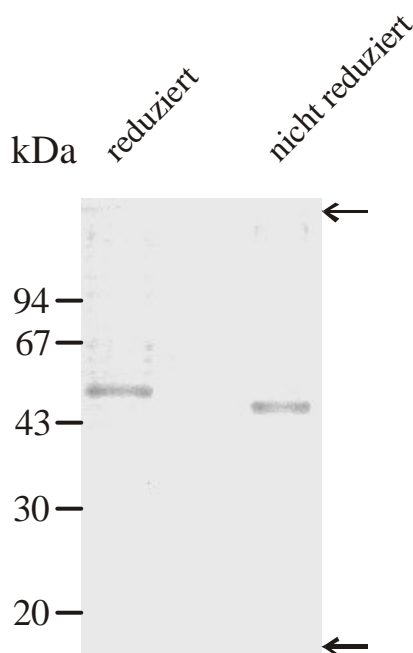
Die Reinheit des Proteins wurde mit Hilfe eines 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gels und anschließender Coomassiefärbung überprüft. Der obere Pfeil markiert den Beginn des Trenngels, der untere die Lage der Lauffront. Auf der linken Seite ist die Laufhöhe der Markerproteine in kDa angegeben.

### 3.2.4 Rekombinante Expression von BM-40 in der humanen Osteosarkomzelllinie MHH-ES-1

Wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben, war die humane Osteosarkomzelllinie MHH-ES-1 die einzige der getesteten Zelllinien, die zumindest teilweise BM-40 mit einem mannose-reichen N-Glykosylierungstyp exprimiert. Aus diesem Grund wurde diese Zelllinie ebenfalls für die rekombinante Expression von BM-40 verwendet.

Die Zellen wurden sowohl stabil mit dem pRc/CMV-Konstrukt als auch episomal mit dem pCEP-Pu/BM-40-Konstrukt transfiziert. In beiden Fällen konnten nach abgeschlossener Selektion nur geringe Überexpressionen von BM-40 im Überstand im Vergleich zu Wildtyp-Zellen detektiert werden. Versuche, das Protein aus gesammelten serumfreien Überständen aufzureinigen schlugen aufgrund geringer Ausbeuten fehl. Aus diesem Grund wurden erneut Zellen episomal transfiziert, diesmal mit dem Konstrukt SP-His6-myc-fX-BM-40-pCEP-Pu. Nach 48 h wurde die Selektion der Zellen mit Puromycin gestartet, welche nach etwa drei Wochen abgeschlossen war. Überlebende Zellen wurden expandiert und unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Im Immunoblot konnte sowohl mit einem Anti-BM-40-Antikörper als

auch mit einem Anti-myc-Antikörper eine deutliche Expression des Fusionsproteins His6-myc-fX-BM-40 im Überstand der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die gesammelten serumfreien Überstände wurden vereinigt und nach Dialyse gegen 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 300 mM NaCl mittels Affinitätschromatographie über eine TALON-Kobaltsäule gereinigt. Nach Dialyse der BM-40-haltigen Fraktionen gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, folgte eine Anionenaustauschchromatographie mit einer ResourceQ-Säule. Die Reinheit des Proteins wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE nachgewiesen (Abb. 3-4). Die Ausbeute betrug etwa 1 mg pro Liter Überstand.



**Abb. 3-4: Rekombinant exprimiertes BM40 aus Kulturüberständen von MHH-ES-1-Zellen**

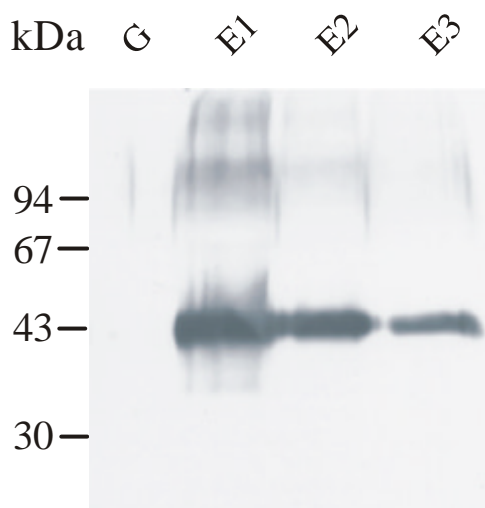
Das gereinigte Protein wurde auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassiefärbung detektiert. Der obere Pfeil markiert den Beginn des Trenngels, der untere die Lage der Lauffront.

### 3.3 Isolierung von BM-40 aus Gewebe

#### 3.3.1 Isolierung von BM-40 aus humanem Knochen

Aus humanen Oberschenkelköpfen hergestelltes Knochenmehl wurde erst mit einem Guanidiniumhydrochlorid-haltigen Puffer extrahiert, um eventuelle Blut- und Knochenmarkreste zu entfernen. Anschließend wurde das Knochenmehl gründlich mit TBS, pH 7.4, gewaschen,

bevor die Extraktion unter nicht denaturierenden Bedingungen mit 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M EDTA und Proteaseinhibitoren durchgeführt wurde. Der EDTA-Puffer wurde zweimal gewechselt. Die Extrakte wurden im Immunoblot auf das Vorhandensein von BM-40 untersucht (Abb. 3-5).



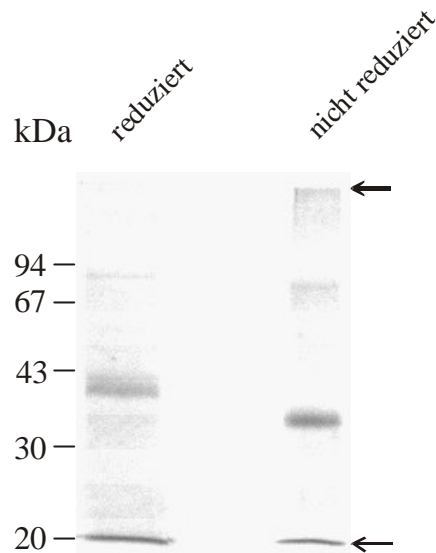
**Abb. 3-5: Extraktion von BM-40 aus humanem Knochenpulver**

Immunoblot mit polyklonalem  $\alpha$ -human-BM-40 Antikörper

Humanes Knochenpulver wurde erst mit einem Guanidiniumhydrochlorid-haltigen Puffer (G-Extrakt) und nach mehrmaligem Waschen mit TBS, pH 7.4, mehrfach mit EDTA-haltigem Puffer (E1-, E2-, E3-Extrakt) extrahiert. Jeweils 2 ml jeder Fraktion wurden gegen TBS, pH 7.4, dialysiert, mit TCA gefällt und nach Aufnahme in reduzierendem Probenpuffer auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

BM-40 wurde in allen drei EDTA-Extraktionsschritten nachgewiesen. Die EDTA-Extrakte wurden vereinigt und gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, dialysiert. Die Reinigung erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie mit einer DEAE-Sepharose-Fast-Flow- und einer ResourceQ-Säule. Anschließend wurden die BM-40-haltigen Fraktionen gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, dialysiert und über eine Hitrap Heparin-Säule chromatographiert. BM-40 bindet schwach an die Säule und wird mit etwa 100 bis 150 mM NaCl eluiert. Die Reinheit des Proteins wurde mit einer SDS-PAGE überprüft (Abb. 3-6). Die Ausbeute betrug etwa 0.5 mg BM-40 pro 100 g Knochenmehl.

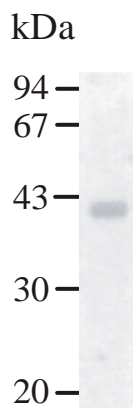




**Abb. 3-6: BM-40 isoliert aus humanem Knochen**

Unter nativen Bedingungen gereinigtes BM-40 aus humanem Knochen wurde auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassiefärbung nachgewiesen. Der obere Pfeil markiert den Beginn des Trenngels, der untere die Lage der Lauffront.

Das so gereinigte Protein wurde für massenspektrometrische und CD-spektroskopische Analysen eingesetzt. Für die N-Glykan-Analyse mußte eine höhere Reinheit des Proteins erreicht werden. Da eine native Struktur des Proteins für diese Analyse nicht von Bedeutung ist, wurde ein Teil des Materials unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von 7 M Harnstoff über eine ResourceQ-Säule weiter aufgereinigt. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung überprüft (Abb. 3-7).

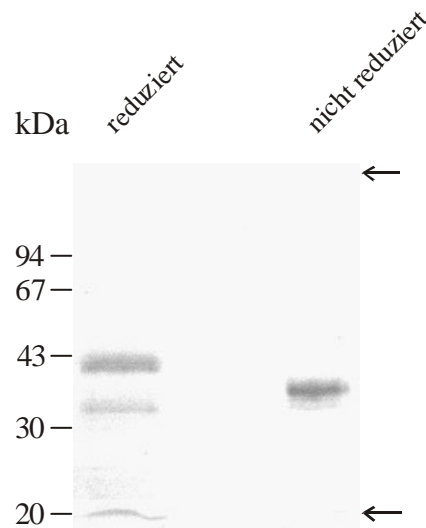


**Abb. 3-7: BM-40 isoliert aus humanem Knochen nach abschließender Reinigung unter denaturierenden Bedingungen**

Nach Reinigung über eine Resource Q-Säule mit 7 M Harnstoff wurde die Reinheit des Proteins mit Hilfe einer SDS-PAGE (12%iges Gel) und anschließender Silberfärbung überprüft.

### 3.3.2 Isolierung von BM-40 aus Maus-EHS-Tumor

BM-40 wurde ebenfalls aus einem Maus-Basalmembran-Tumor isoliert. Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumorgewebe wurde von Uwe Odenthal (Institut für Biochemie II, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln) extrahiert und in einem ersten Schritt über eine Gelfiltration mit einer CL4B-Säule gereinigt. Die BM-40-haltigen Fraktionen wurden mir zur Verfügung gestellt und mittels Anionenaustauschchromatographie mit einer DEAE-Sepharose-Fast-Flow- und einer ResourceQ-Säule gereinigt. Da nur wenig Material zur Verfügung stand und nur Analysen durchgeführt werden sollten, für die eine native Struktur des Proteins ohne Bedeutung ist, erfolgte eine abschließende Anionenaustauschchromatographie mit einer ResourceQ-Säule unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von 7 M Harnstoff. Die Reinheit des Proteins wurde mit einem coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel überprüft (Abb. 3-8). Reduzierend sind ebenfalls Banden bei 35 kDa und in der Lauffront zu erkennen. Hierbei handelt es sich um proteolytische Fragmente von EHS-BM-40, wie sie aus der Literatur bekannt sind (Dziadek et al. 1986; Mann et al., 1987). Die Bande bei 35 kDa wird durch einen polyklonalen Antikörper gegen Maus-BM-40 erkannt (Abb. 3-11). Weiterhin findet man unter nicht reduzierenden Bedingungen nur eine Bande im SDS-Gel, unter diesen Bedingungen sind die proteolytischen Fragmente über Disulfidbrücken noch miteinander verbunden.



**Abb. 3-8: BM-40 isoliert aus Maus-EHS-Tumor**

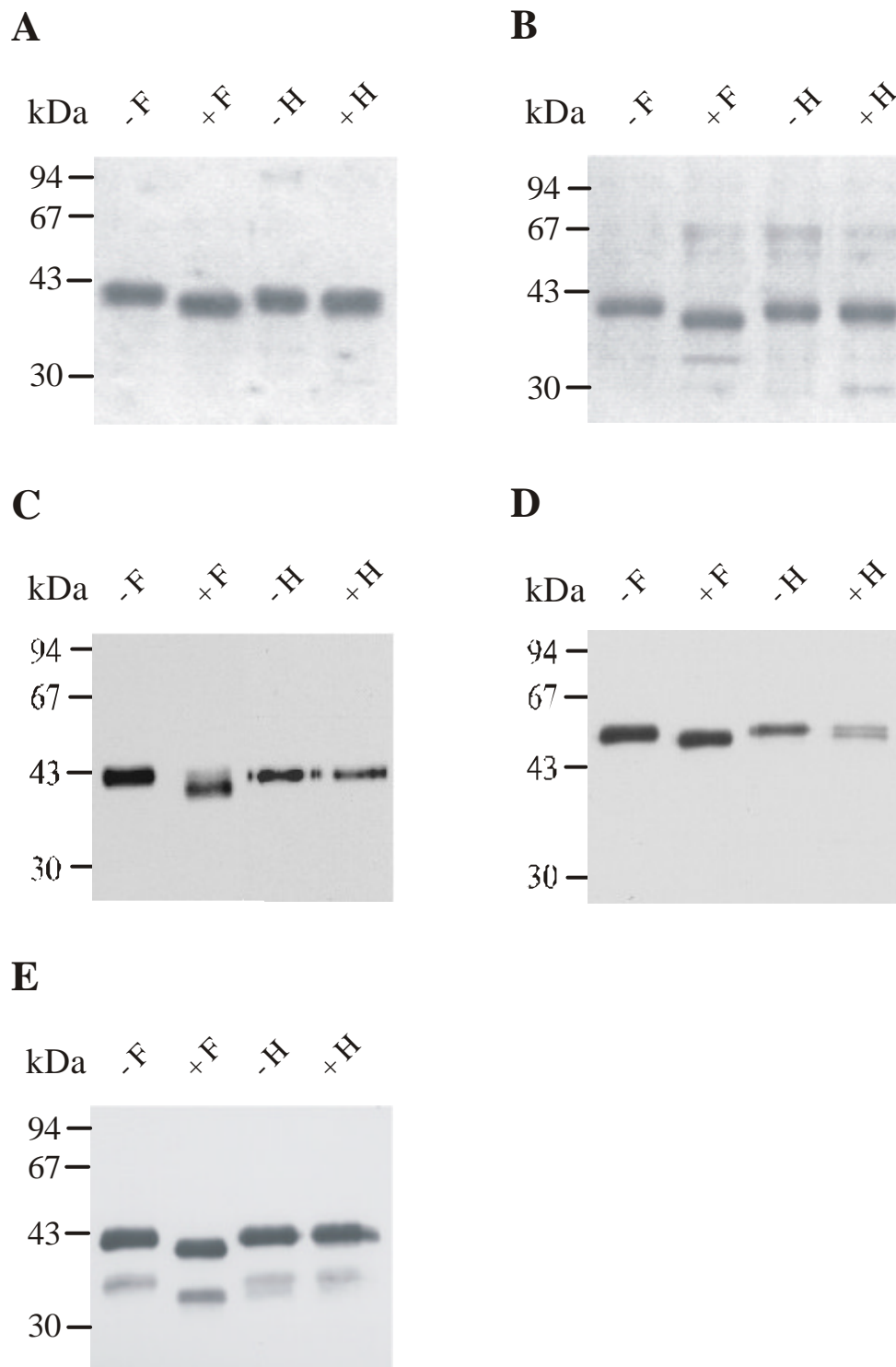
Das gereinigte Protein wurde unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Der obere Pfeil markiert den Beginn des Trenngels, der untere die Position der Lauffront.

### 3.4 Glykosylierungsmuster der gereinigten Proteine

Die gereinigten Proteine sowie BM-40 aus humanen Blutplättchen wurden über Nacht mit N-Glykosidase F bzw. Endoglykosidase H verdaut. Zum Vergleich wurden Negativkontrollen ohne Enzym ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3-9). Das Glykosylierungsmuster von BM-40 isoliert aus humanem Knochen ist in Abb. 3-1 zu sehen.

In allen Fällen konnte eine deutliche Verschiebung der BM-40-Bande im SDS-Gel nach Verdau mit N-Glykosidase F beobachtet werden, d.h. alle Proteine sind N-glykosyliert. Bei BM-40 aus EBNA-293-Zellen, SaOS-2-Zellen, humanen Blutplättchen und Maus-EHS-Tumor war keine Verschiebung im Gel nach Endoglykosidase H-Verdau detektierbar, d.h. diese Proteine besitzen eine N-Glykosylierung vom komplexen Typ. Lediglich Knochen-BM-40 zeigt eine deutliche Verschiebung nach Endoglykosidase H-Verdau und trägt somit eine mannose-reiche Zuckerstruktur. Für His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen ist nach Verdau mit Endoglykosidase H eine Doppelbande im SDS-Gel zu erkennen. Diese Zelllinie sekretiert möglicherweise ein Gemisch unterschiedlicher BM-40-Glykoformen.

Bei der Analyse des N-Glykosylierungstyps von SaOS-2-BM-40 (Abb. 3-9 B) kann man im coomassiegefärbten SDS-Gel bei der Probe mit N-Glykosidase F eine Bande bei ca. 35 kDa und bei der Probe mit Endoglykosidase H eine Bande bei ca. 29 kDa erkennen. Dabei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Enzyme selbst. Nach Angaben des Herstellers beträgt das Molekulargewicht von N-Glykosidase F 34.6 kDa und von Endoglykosidase H 29 kDa.



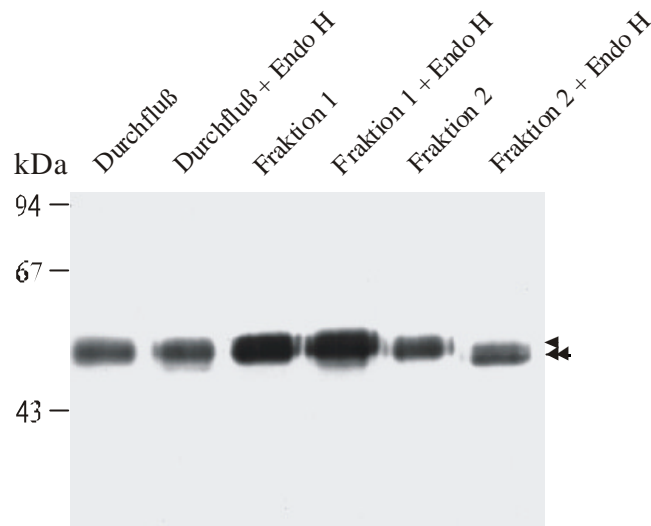
**Abb. 3-9: Analyse des N-Glykosylierungstyps von rekombinantem und aus Gewebe isoliertem BM-40**

Humanes BM-40 aus EBNA-293-Zellen (A), SaOS-2-Zellen (B), Blutplättchen (C) und His6-myc-fX/BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen (D) sowie Maus-BM-40 aus EHS-Tumor (E) wurde über Nacht mit N-Glykosidase F (F) bzw. Endoglykosidase H (H) inkubiert und zusammen mit identisch behandelten Proben ohne Enzym auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. In A und B erfolgte der Nachweis des Proteins durch Coomassiefärbung, in C und D mittels Immunoblot mit einem polyklonalen Antikörper gegen humanes BM-40 und in E mittels Immunoblot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Maus-BM-40.

## 3.5 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A

### 3.5.1 His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen

Wie bereits beschrieben, gab es Hinweise darauf, daß MHH-ES-1-Zellen ein Gemisch unterschiedlich glykosylierter BM-40-Isoformen sekretieren. Um dies zu untersuchen, wurde ein Teil des gereinigten His6-myc-fX-BM-40 mit Hilfe einer Concanavalin A-Säule analysiert. Das Lektin Concanavalin A (Con A) bindet bevorzugt  $\alpha$ -Methylmannopyranoside vor  $\alpha$ -D-Mannose vor  $\alpha$ -D-Glukose vor  $\alpha$ -N-Acetylglukosamin. Es bindet sehr stark an Kohlenhydrate mit terminalen Mannose- oder Glukose-Resten. Das Protein wurde hierfür zunächst gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl dialysiert und nach Zugabe von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM  $\text{MnCl}_2$  über eine Hitrap Con A-Säule gegeben. Die Elution der Con A-Säule erfolgte in zwei Schritten: im ersten Schritt wurden schwach bindende Glykoformen mit 15 mM Methyl- $\alpha$ -D-Glukopyranosiden eluiert (Fraktion 1), im zweiten stark bindende mit 500 mM Methyl- $\alpha$ -D-Glukopyranosiden (Fraktion 2). His6-myc-fX-BM-40 wurde im Durchfluß und in beiden Fraktionen detektiert. Die Behandlung der Proben mit Endoglykosidase H in 100 mM Natriumacetat, pH 5.8, über Nacht zeigte sowohl im Immunoblot (Abb. 3-10) als auch in massenspektrometrischen Analysen (Abb. 3-11) für den Durchfluß und Fraktion 1 keine Endoglykosidase H-sensitive Glykosylierung, was auf eine Glykosylierung vom komplexen Typ hinweist, während in Fraktion 2 BM-40 enthalten ist, welches Endo H-sensitiv ist und somit eine N-Glykosylierung vom Hybrid- oder Oligomannose-Typ aufweist.



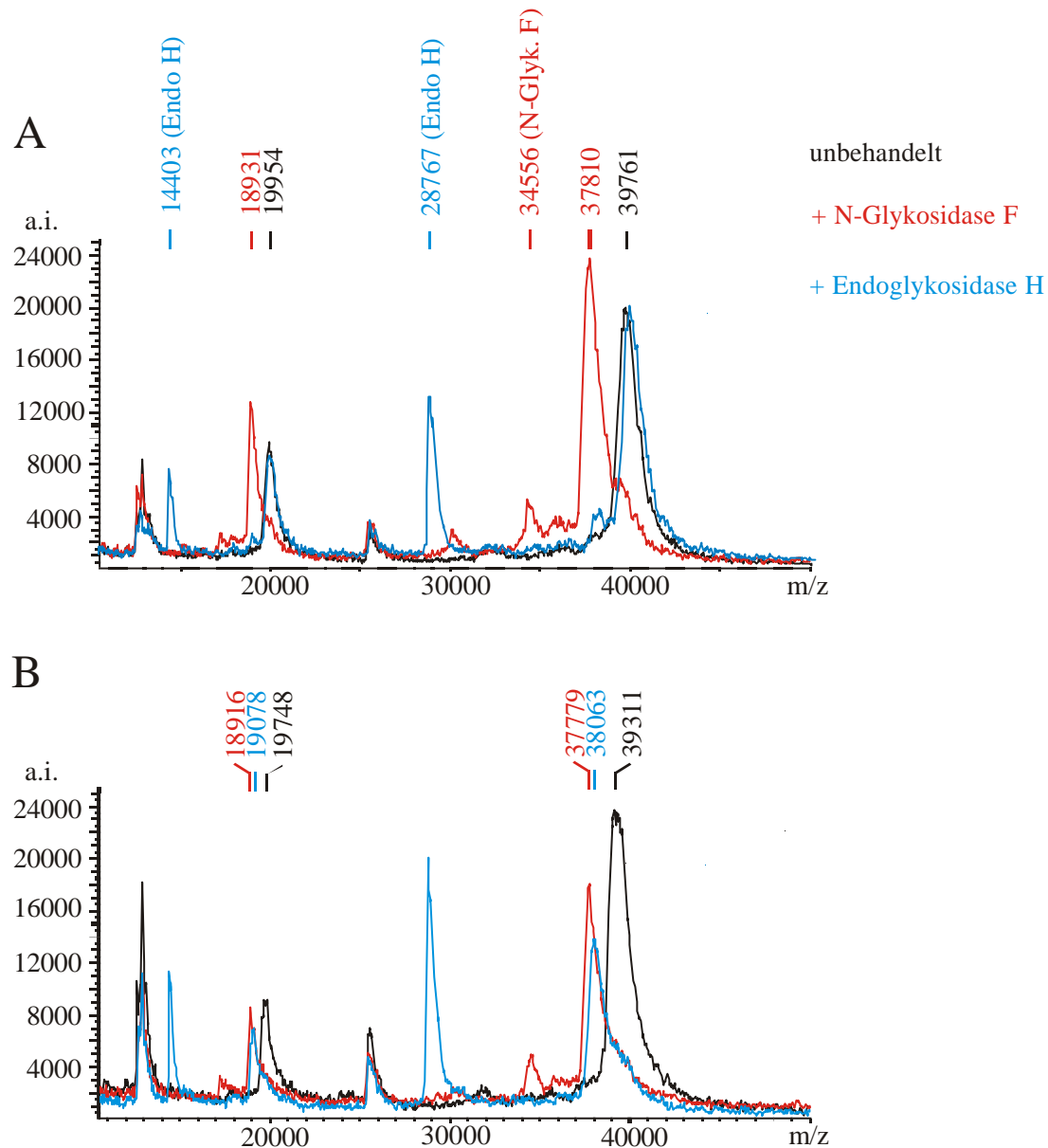
**Abb. 3-10: Glykosylierungsanalyse von Con A-Fractionen von His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen mit Endoglykosidase H**

Immunoblot mit polyklonalem  $\alpha$ -human-BM-40 Antikörper

Jeweils 30  $\mu$ l der Con A-Fractionen (Durchfluß, Elution mit 15 mM Methylglukosid (=Fraktion 1), Elution mit 500 mM Methylglukosid (=Fraktion 2)) wurden über Nacht mit Endoglykosidase H verdaut. Die Proben wurden reduziert und über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Pfeilspitze markiert unverdautes, die doppelte Pfeilspitze mit Endo H verdautes BM-40.

In Abb. 3-11 sind ebenfalls die Massenspektren der mit N-Glykosidase F behandelten Proben dargestellt. Erwartungsgemäß ist hier in beiden Fraktionen eine Verschiebung festzustellen.

Insbesondere die Daten der MALDI-TOF Massenspektrometrie demonstrieren deutlich eine erfolgreiche Trennung der unterschiedlichen His6-myc-fX-BM-40-Glykoformen, welche von MHH-ES-1-Zellen exprimiert werden. Die massenspektrometrischen Daten werden hinsichtlich der Molekulargewichte der unbehandelten und behandelten Proben in Abschnitt 3.6, Tab. 3-2, genauer diskutiert.

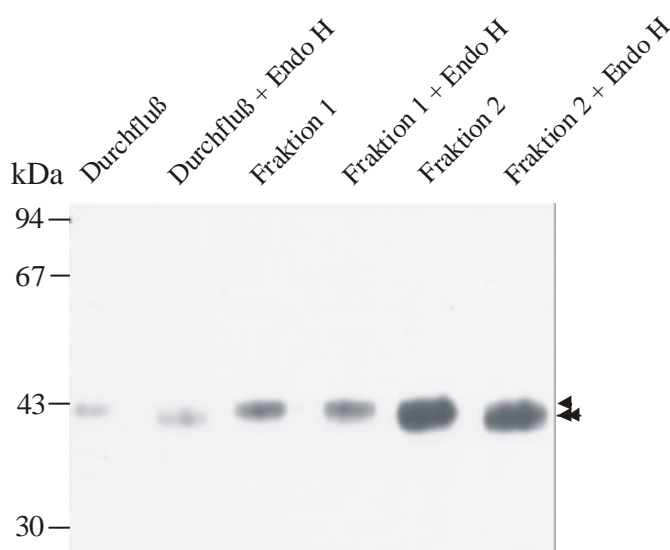


**Abb. 3-11: Massenspektrometrische Analyse von His6-myc-fX-BM-40 nach Affinitätschromatographie mit Concanavalin A und anschließendem Verdau mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H**

Aliquots der Con A-Fractionen 1 (A) und 2 (B) wurden unbehandelt und nach Verdau mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H durch MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Im Massenspektrum der mit Endoglykosidase H verdauten Proben ist bei einem Wert von 28767 ein Signal zu sehen, welches von dem zugesetzten Enzym stammt. Gleiches gilt für das Signal bei einem Wert von 34556 im Massenspektrum der mit N-Glykosidase F verdauten Proben. Diese Werte stimmen mit den vom Hersteller angegebenen Molekulargewichten von 29 kDa für Endoglykosidase H und 34.6 kDa für N-Glykosidase F überein. Weiterhin sind in allen Spektren bei den jeweils halben m/z-Werten Signale für die jeweiligen zweifach geladenen Moleküle zu sehen.

### 3.5.2 BM-40 isoliert aus humanem Knochen

Analog zu His6-myc-fX-BM-40 wurde auch eine Affinitätschromatographie mit einer Hitrap Con A-Säule für BM-40 aus humanem Knochen durchgeführt. BM-40 wurde sowohl im Durchfluß als auch in den beiden mit niedriger bzw. hoher Methylglukosid-Konzentration eluierten Fraktionen nachgewiesen. Nach Behandlung mit Endoglykosidase H wurden die Proben zur Identifizierung des Glykosylierungstyps im Immunoblot analysiert (Abb. 3-12).



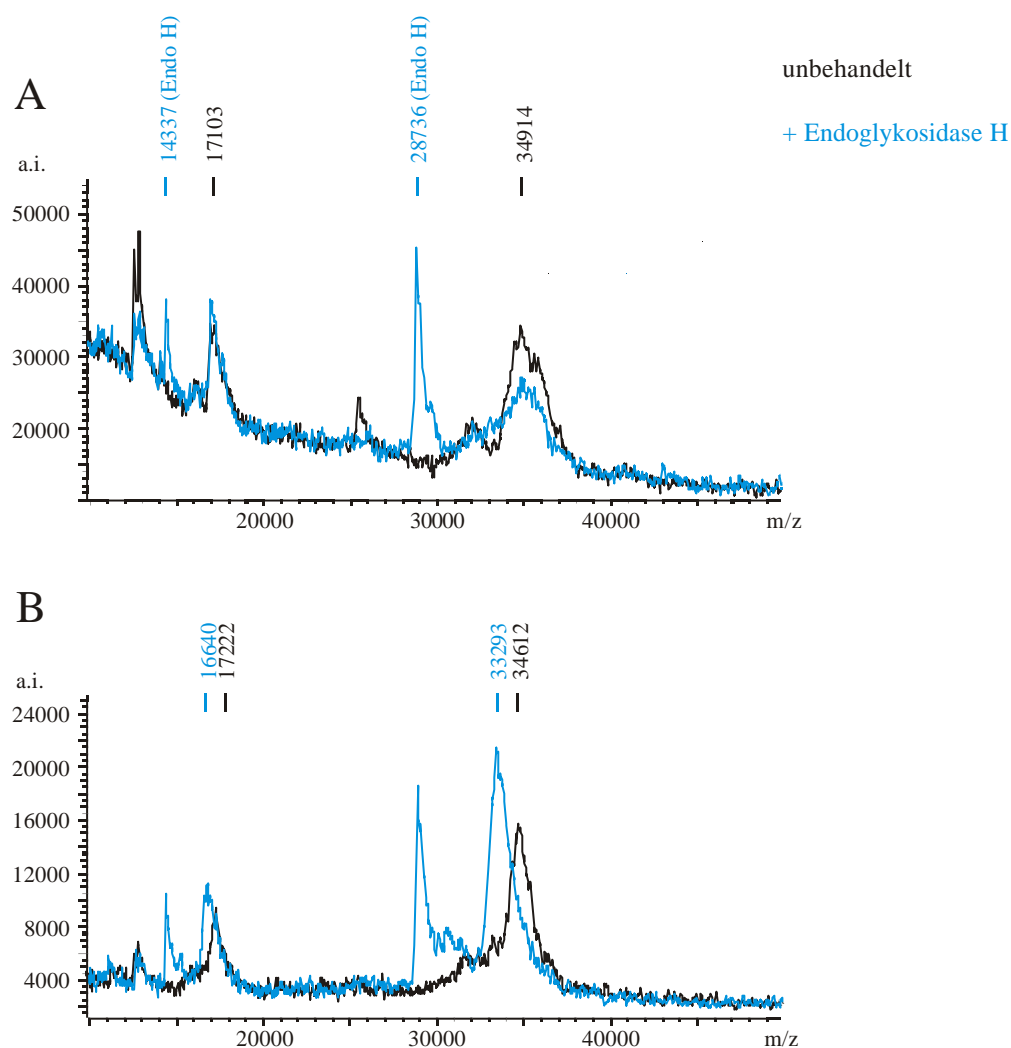
**Abb. 3-12: Glykosylierungsanalyse von ConA-Fraktionen von BM-40 aus humanem Knochen mit Endoglykosidase H**

Immunoblot mit polyklonalem  $\alpha$ -human-BM-40 Antikörper

Jeweils 30  $\mu$ l der ConA-Fraktionen (Durchfluß, Elution mit 15 mM Methylglukosid (=Fraktion 1), Elution mit 500 mM Methylglukosid (=Fraktion 2)) wurden über Nacht mit Endoglykosidase H verdaut. Die Proben wurden reduziert und über ein 12 %iges SDS-Gel aufgetrennt. Die Pfeilspitze markiert unverdautes, die doppelte Pfeilspitze mit Endo H verdautes BM-40.

Im Durchfluß ist Endoglykosidase H-sensitives BM-40 vorhanden, was auf eine nicht vollständige Bindung von mannose-reichem BM-40 an die Con A-Säule zurückzuführen ist. Entgegen den Erwartungen enthält auch die schwach bindende Fraktion 1 BM-40. Dieses ist eindeutig resistent gegen Endoglykosidase H, was auf einen komplexen N-Glykosylierungstyp hinweist. Die stark bindende Fraktion 2 weist eine schwache Verschiebung im Immunoblot auf und enthält somit BM-40 mit einer mannose-reichen Glykosylierung. Für Fraktion 1 und 2 wurden diese Ergebnisse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie verifiziert (Abb. 3-13).





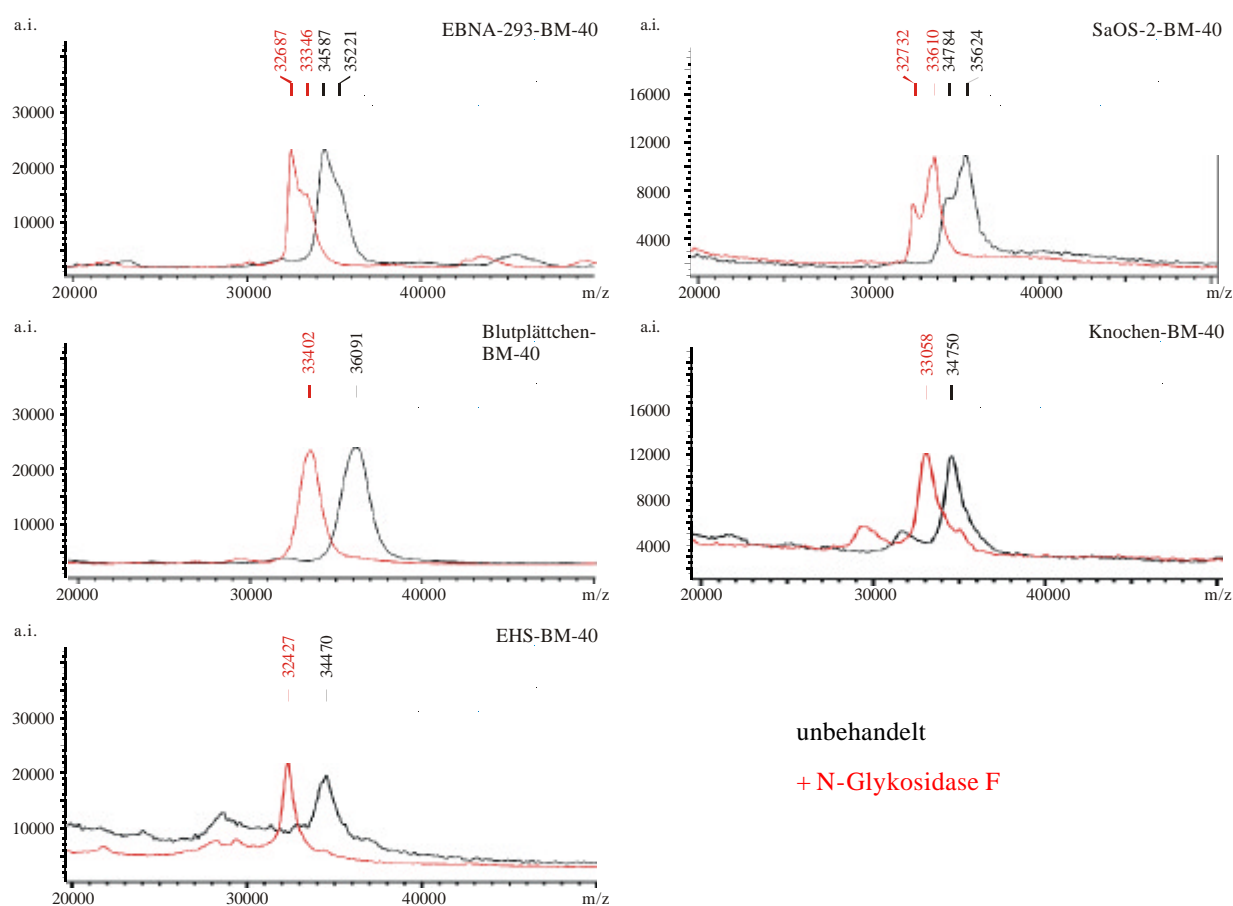
**Abb. 3-13: Massenspektrometrische Analyse von BM40 aus Knochen nach Affinitätschromatographie mit Concanavalin A und anschließendem Verdau mit Endoglykosidase H**

Aliquots der Con A-Fractionen 1 (A) und 2 (B) wurden unbehandelt und nach Verdau mit Endoglykosidase H durch MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Ebenso wie bei den Massenspektren von His6-myc-fX-BM-40 (Abb. 3-11) sind auch in den hier gezeigten Spektren Signale für Endoglykosidase H sowie Signale, die durch zweifach geladene Moleküle entstehen, detektierbar.

Die massenspektrometrische Analyse von unbehandelten sowie mit Endoglykosidase H behandelten Proben zeigt eindeutig, daß die Fraktion 1 gegen Endoglykosidase H resistentes BM-40 mit einer komplexen Glykosylierung enthält, während die Fraktion 2 Endoglykosidase H-sensitives BM-40 mit einer N-Glykosylierung vom Oligomannose- oder Hybrid-Typ enthält. Diese Resultate stimmen auf den ersten Blick nicht mit den in der Literatur veröffentlichten Daten (Kelm and Mann, 1991) überein. Aufgrund der damaligen Ergebnisse wurde für BM-40 aus humanem Knochen eine vollständige Glykosylierung vom Oligomannose-Typ postuliert.

### 3.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Sämtliche gereinigten Proteine sowie kommerziell erhältliches BM-40 aus humanen Blutplättchen wurden unbehandelt sowie nach Behandlung mit N-Glykosidase F mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Das aus Knochen gereinigte BM-40 wurde dabei nicht, wie in Abschnitt 3.5.2, durch vorherige Affinitätschromatographie mit Con A aufgetrennt, sondern es wurde der Gesamt-Pool an Knochen-BM-40 eingesetzt. Die Spektren sind in Abb. 3-14 dargestellt und die daraus ermittelten Daten sind in Tab. 3-2 zusammengefaßt. Die Werte für His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen wurden Abb. 3-11 entnommen.



**Abb. 3-14: MALDI-TOF-Massenspektrometrie von rekombinantem und aus Gewebe isoliertem BM-40**

Die Proteine wurden jeweils auf eine Konzentration von 5 bis 10 pmol/μl in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, eingestellt und unverdaut bzw. nach Verdau mit N-Glykosidase F massenspektrometrisch analysiert.

**Tab. 3-2: Molekulargewicht (MW) von rekombinantem und aus Gewebe isoliertem BM-40**

Die Molekulargewichte wurden den Abbildungen 3-11 und 3-14 entnommen. Das höhere Molekulargewicht von BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen ist eine Folge der N-terminalen His6-myc-fX-Sequenz.

	MW unbehandelt [kDa]	MW nach Verdau mit N-Glyko- sidase F [kDa]	mittleres MW der N-Glykane [kDa]	MW theoretisch [kDa]
EBNA-293- Zellen	34.6 35.2	32.7 33.3	1.9	32.7
SaOS-2-Zellen	34.8 35.6	32.7 33.6	2.0	32.7
MHH-ES-1- Zellen	39.3 39.8	37.8	1.5 2.0	37.8
Knochen	34.8	33.1	1.7	32.7
Blutplättchen	36.1	33.4	2.7	32.7
EHS-Tumor	34.5	32.4	2.1	32.4

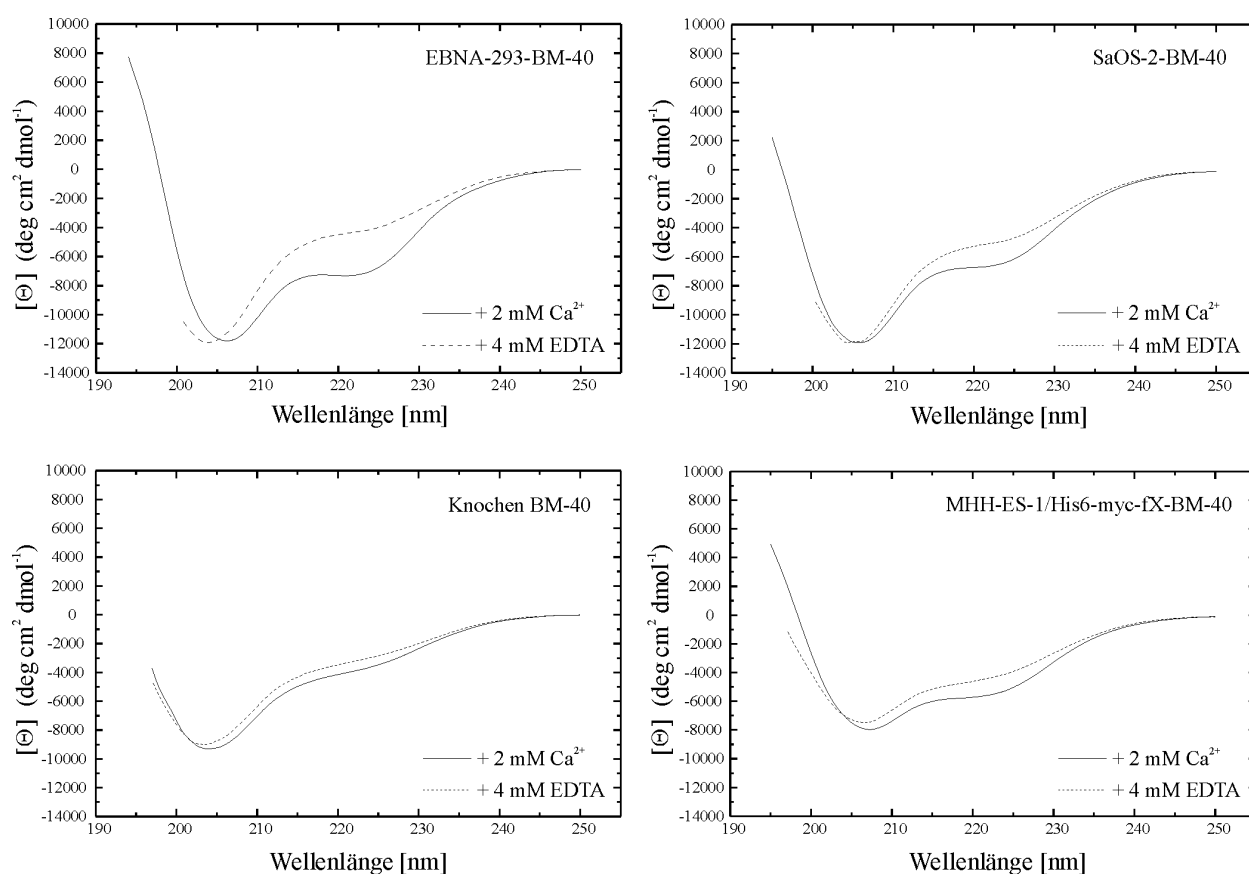
Die Differenz der Molekulargewichte von unbehandelten und mit N-Glykosidase F behandelten Proteinen ergibt die mittlere Masse der N-Glykane. Diese liegt je nach Herkunft des Proteins zwischen 1.5 und 2.7 kDa. Die höhere theoretische Masse des rekombinanten Proteins aus MHH-ES-1-Zellen ist eine Folge der zusätzlichen N-terminalen His6-myc-fX-Sequenz. Nur BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen sowie aus Maus-EHS-Tumor weist nach Deglykosylierung eine Masse auf, die dem theoretischen Molekulargewicht der Aminosäurekette entspricht, d.h. diese Proteine tragen höchstwahrscheinlich keine weitere posttranslationale Modifizierung. Dagegen besitzen etwa 40 % des EBNA-293-BM-40, 60 % des SaOS-2-BM-40 sowie das gesamte Material aus humanem Knochen und humanen Blutplättchen nach vollständiger Deglykosylierung ein Molekulargewicht, das 0.4 kDa (Knochen), 0.7 kDa (Blutplättchen) bzw. 0.9 kDa (SaOS-2-Zellen) über dem theoretischen Molekulargewicht liegt, d.h. diese Proteine tragen sehr wahrscheinlich weitere posttranslationale Modifizierungen.

### 3.7 Circular Dichroismus-Spektroskopie

Die Analyse der Sekundärstruktur der nativ gereinigten Proteine erfolgte mit Hilfe der CD (Circular Dichroismus)- Spektroskopie. Frühere Studien mit EHS-BM-40 und rekombinant-

em BM-40 aus 293-Zellen zeigten eine calciuminduzierte Konformationsänderung und eine damit verbundene Erhöhung des  $\alpha$ -helikalen Anteils um etwa 30 % (Maurer et al., 1992, Pottgiesser et al., 1994), welche durch die extrazelluläre calciumbindende (EC) Domäne hervorgerufen wird (Maurer et al., 1995). Diese Domäne besitzt einen stark  $\alpha$ -helikalen Bereich sowie zwei EF-Hand-Motive.

Die Spektren wurden jeweils nach Zugabe von Calcium bzw. EDTA aufgenommen und auf die spezifische Elliptizität normiert. Die Spektren sind in Abb. 3-15 dargestellt.



**Abb. 3-15: CD-Spektren von rekombinantem und nativ aus Knochen gereinigtem BM-40**

Die CD-Spektren der rekombinanten Proteine sowie von nativ gereinigtem Knochen-BM-40 wurden in 5 mM Tris-HCl pH 7.4 mit  $\text{Ca}^{2+}$  bzw. nach Zugabe von EDTA aufgenommen.

Alle gemessenen BM-40-Proteine zeigten eine reversible, mehr oder weniger ausgeprägte calciuminduzierte Konformationsänderung, welche im CD-Spektrum durch Änderung der Signalstärke bei 220 nm sichtbar wird. Die Signalintensität bei 220 nm wird hauptsächlich durch  $\alpha$ -Helix-Strukturen hervorgerufen. Die theoretische Berechnung der Sekundärstrukturanteile wurde mit den Programmen CONTIN und SELCON durchgeführt (Tab. 3-3).

**Tab. 3-3: Berechnung der Sekundärstrukturanteile von rekombinantem und nativ aus Knochen gereinigtem BM-40 mit CONTIN und SELCON**

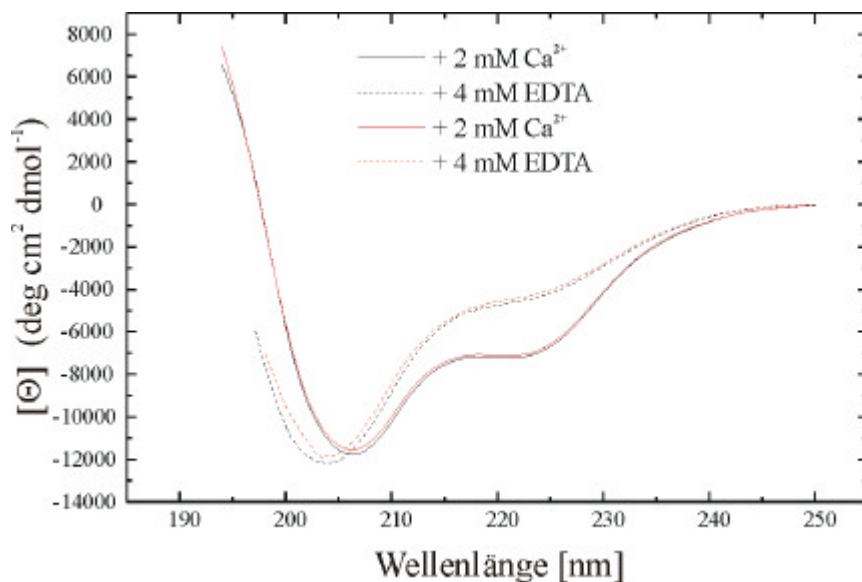
Die Werte ohne Klammern beziehen sich auf die mit Calcium gesättigten Proteine, die Werte in den Klammern auf die Proteine ohne Calcium.

		EBNA-293-BM-40	SaOS-2-BM-40	Knochen-BM-40	MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40
CONTIN	$\alpha$ -Helix	31 % (21 %)	27 % (24 %)	18 % (16 %)	23 % (20 %)
	$\beta$ -Faltblatt	28 % (27 %)	27 % (26 %)	31 % (33 %)	29 % (30 %)
	Schleife	23 % (30 %)	26 % (29 %)	29 % (28 %)	26 % (27 %)
	ungeordnet	19 % (22 %)	20 % (21 %)	22 % (23 %)	21 % (23 %)
SELCON	$\alpha$ -Helix	22 % (9 %)	20 % (15 %)	9 % (8 %)	12 % (10 %)
	$\beta$ -Faltblatt	25 % (31 %)	25 % (28 %)	37 % (32 %)	40 % (37 %)
	Schleife	21 % (29 %)	24 % (26 %)	27 % (26 %)	23 % (25 %)
	ungeordnet	32 % (31 %)	32 % (32 %)	27 % (33 %)	25 % (28 %)

Die stärkste im CD-Spektrum sichtbare calcium-induzierte Konformationsänderung wurde für EBNA-293-BM-40 beobachtet. Die Auswertung mit CONTIN ergab eine Steigerung des  $\alpha$ -helikalen Anteils von 21 % auf 31 % durch Zugabe von Calcium, mit SELCON von 9 % auf 22 %. Etwas geringer aber immer noch deutlich ist die beobachtete Konformationsänderung von BM-40 aus SaOS-2-Zellen. Mit CONTIN erhält man hierbei eine Steigerung des  $\alpha$ -helikalen Anteils von 24 % auf 27 %, mit SELCON von 15 % auf 20 %. Für beide Proteine erfolgt nach Calciumzugabe somit eine Erhöhung des  $\alpha$ -helikalen Anteils und eine Reduzierung des Anteils an Schleifen, während der Anteil an den restlichen Strukturen eher konstant bleibt. Rekombinantes His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen und nativ gereinigtes BM-40 aus humanem Knochen weisen nur eine geringe, jedoch reproduzierbare und reversible calcium-induzierte Konformationsänderung auf. Im Fall von His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen muß man jedoch berücksichtigen, daß die zusätzliche N-terminale Sequenz ebenfalls einen Beitrag zum CD-Signal leistet.

Die geringste Konformationsänderung nach Calciumzugabe zeigt BM-40 aus humanem Knochen. Um auszuschließen, daß dieser Effekt durch die Bedingungen der Knochenextraktion hervorgerufen wurde, wurde EBNA-293-BM-40 schrittweise gegen den Puffer, mit dem BM-40 aus dem Knochen extrahiert wurde (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M EDTA, + Protease-inhibitoren), und anschließend gegen 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, dialysiert. Parallel wurde eine

Probe nur gegen 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, dialysiert. Die CD-Spektren beider Proben wurden nach Zugabe von Calcium bzw. EDTA aufgenommen (Abb. 3-16). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Proben nachgewiesen werden.



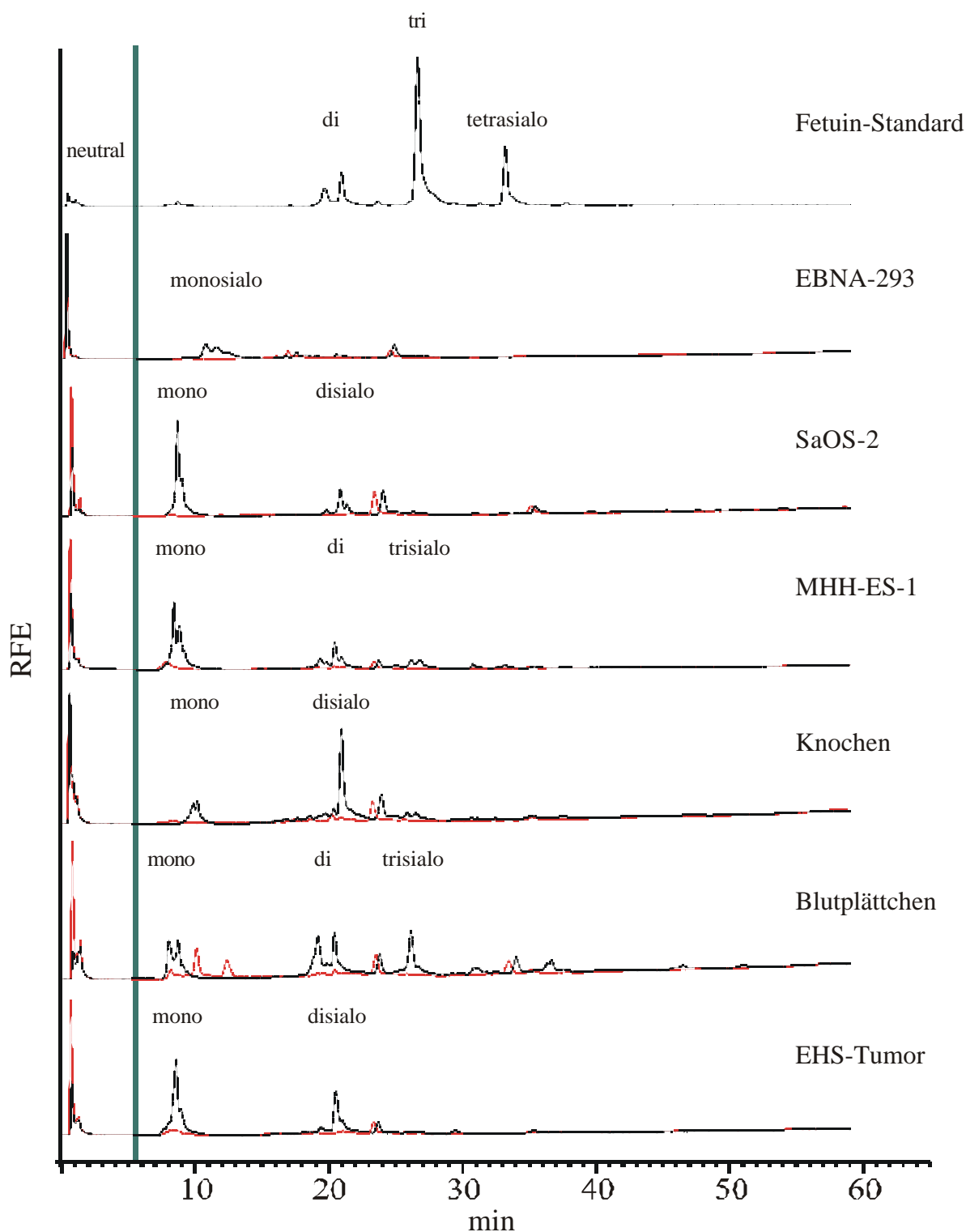
**Abb. 3-16: CD-Spektren von BM-40 aus EBNA-293-Zellen**

Dargestellt sind die CD-Spektren von EBNA-BM-40 in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, (schwarz) sowie von EBNA-BM-40 in 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, nach vorheriger Dialyse gegen Knochenextraktionsbedingungen (0.5 M EDTA in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, + Proteaseinhibitoren, (rot)).

## 3.8 Analyse der in BM-40 auftretenden N-Glykane

### 3.8.1 Bestimmung des Sialinsäuregehaltes

Die N-Glykane wurden enzymatisch mit N-Glykosidase F von den Proteinen abgetrennt und an ihrem reduzierenden Ende kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminobenzamid (2-AB) markiert. Um das Vorhandensein und die Anzahl an terminalen Sialinsäuren zu untersuchen, wurden die markierten N-Glykane nach ihrer Ladung auf einer HPLC-Anionenaustauschersäule (Q Hyper D10) aufgetrennt (Abb. 3-17).



**Abb. 3-17: Untersuchung der sialinsäurehaltigen N-Glykane von rekombinantem und aus Gewebe isoliertem BM-40**

Dargestellt sind die Anionenaustauscher-HPLC-Profile der unbehandelten (schwarz) bzw. mit Sialidase behandelten (rot) fluoreszenzmarkierten N-Glykane. Als Vergleich zur Bestimmung der Anzahl an Sialinsäuren dienen die bekannten N-Glykane von Fetuin. Neutrale Glykane (ohne Sialinsäuren) befinden sich im Durchfluß. Ab der grünen Achse wurden die Signale 4fach verstärkt. (RFE = Relative Fluoreszenzeinheiten)

Je mehr Sialinsäuren an die Glykane gebunden sind, desto höher ist ihre negative Ladung und desto später werden sie von der Säule eluiert. Neutrale Zucker ohne Sialinsäuren befinden sich im Durchfluß. Die Proben wurden ebenfalls mit Sialidase behandelt und analysiert. Nach Abspaltung der Sialinsäuren erhält man nur noch ein Signal im Durchfluß. Als Standard für die Anzahl der gebundenen Sialinsäuren wurden Fetuin sowie Transferrin (nicht gezeigt) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-4 zusammengefaßt.

**Tab. 34: Vergleich der sialinsäurehaltigen NGlykan-Strukturen von rekombinantem und aus Gewebe isoliertem BM-40**

Aufgeführt sind die aus den Peakflächen in Abb. 3-17 berechneten prozentualen Anteile an N-Glykanen ohne (neutral) bzw. mit (mono-, di-, trisialo) terminalen Sialinsäuren. Tetrasialo-Strukturen wurden für BM-40 nicht gefunden.

	neutral	monosialo	disialo	trisialo
EBNA-293-Zellen	81.6 %	18.4 %		
SaOS-2-Zellen	48.6 %	38.7 %	12.7 %	
MHH-ES-1-Zellen	47.5 %	30.5 %	15.8 %	6.2 %
Knochen	71.7 %	9.8 %	18.5 %	
Blutplättchen	43.7 %	19 %	26 %	11.3 %
EHS-Tumor	45 %	31.8 %	23.2 %	

Sämtliche analysierten BM-40-Proteine enthalten je nach Herkunft des Proteins variierende Anteile an neutralen N-Glykanen, wobei EBNA-293-BM-40 den höchsten (81.6 %) und Blutplättchen-BM-40 den geringsten Anteil (43.7 %) besitzt. EBNA-293-BM-40 besitzt als einziges der untersuchten Proteine neben neutralen Zuckerstrukturen nur noch monosialo Strukturen, alle anderen tragen zusätzlich noch disialo bzw. trisialo (Blutplättchen-BM-40 sowie MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40) Strukturen. Tetrasialo Strukturen wurden für BM-40 nicht gefunden.



### 3.8.2 Untersuchung der N-Glykan-Strukturen

Die weitere Analyse der fluoreszenz-markierten N-Glykane wurde mit Hilfe einer Normalphasen-HPLC-Säule (NP-HPLC, Astec NH<sub>2</sub>-Polymer) durchgeführt. Die Trennung der unterschiedlichen N-Glykanstrukturen erfolgt bei dieser Säule nach Hydrophilie und Größe. Da sialinsäurehaltige Strukturen so stark an die Säule binden, daß sie unter den verwendeten Bedingungen nicht eluiert werden, wurden die Proben vorher mit Sialidase verdaut. Zur Aufklärung der Strukturen wurden die asialo N-Glykane mit spezifischen terminalen Glykosidasen sequenziell verdaut und ebenfalls mittels NP-HPLC analysiert. Komplexe N-Glykane wurden dabei schrittweise bis zur allen N-Glykanen gemeinsamen Pentasaccharid-Struktur (M3) abgebaut. Durch Vergleich mit Standards bekannter Struktur (Tab. 3-5) konnten die N-Glykan-Strukturen der BM-40-Proteine ermittelt werden. Im folgenden werden die Glykan-Strukturen mit Abkürzungen bezeichnet. M3 bezeichnet dabei die Pentasaccharid-Struktur (core-Struktur), Man5 bis Man9 bezeichnen Oligomannose5- bis Oligomannose9-Strukturen, F weist auf eine in  $\alpha$ -1,6-Stellung gebundene Fukose an der core-Struktur hin und mit B (bisecting) wird ein N-Acetylglukosamin bezeichnet, das sich in  $\beta$ -1,4-Position an der zentralen Mannose der core-Struktur befindet. Bei komplexen N-Glykanen wird die Anzahl der Antennen angegeben (hier: A2=biantennär bis A4=tetraantennär) sowie die Anzahl der gebundenen terminalen Galaktosen (G).

Um die NP-HPLC-Profile untereinander und mit den Profilen der Standards zu vergleichen und eventuelle Abweichungen beispielsweise durch Temperaturschwankungen zu korrigieren, wurden stets Oligoglukosestandards unter identischen Bedingungen mit aufgetrennt. Durch Vergleich der Retentionszeiten des Oligoglukosestandards mit den Peaks der gemessenen Proben konnten die Peaks der Standards (Tab. 3-5) sowie der BM-40-N-Glykane in Glukoseeinheiten umgerechnet werden. Erfahrungsgemäß kann es dabei zu Abweichungen von  $\pm 0.1$  Glukoseeinheiten kommen. Gelegentlich waren die Profile aufeinanderfolgender HPLC-Läufe gegeneinander verschoben. Aus diesem Grund wurde die N-Glykan-Analyse für jedes Protein mindestens zweimal und an verschiedenen Tagen durchgeführt, um eine genauere Zuordnung der Strukturen zu erreichen. Die Aufklärung der N-Glykan-Strukturen erfolgte durch eine Kombination der Betrachtung des sequenziellen Abbaus mit terminalen Glykosidasen und Vergleich mit den bekannten Standards.

Als Standard N-Glykane wurden entweder die aus Ribonuklease B (für Oligomannose-Strukturen) oder asialo Fetuin freigesetzten N-Glykane und deren durch sequenziellen Abbau erhaltenen Zwischenstufen oder kommerziell erhältliche N-Glykane verwendet.

**Tab. 3-5: Verwendete N-Glykan-Standards**

Die Oligomannose-Glykane gehen auf Ribonuklease B zurück. M3, A2G0, A3G0, A2G2 und A3G3 gehen auf asialo Fetuin und seine durch Verdau mit terminalen Glykosidasen entstehenden Abbauprodukte zurück. Bei den übrigen Glykanen handelt es sich um kommerziell erhältliche Standards, wobei A2G0B durch Verdau von A2G0FB mit  $\alpha$ -1,6-Fukosidase erhalten wurde. Durch Vergleich der Retentionszeiten der Standard-N-Glykane mit dem Oligoglukosestandard erfolgte eine Umrechnung in Glukoseeinheiten.

Standard	Glukoseeinheiten	Standard	Glukoseeinheiten
M3	5.2	A3G3	9.8
A2G0	6.9	Hybrid	8.4
A2G0B	7.3	Man5	7.1
A2G0FB	7.7	Man6	8.1
A3G0	7.4	Man7	9.2
A4G0	8.3	Man8	10.1
A2G2	8.5	Man9	10.9

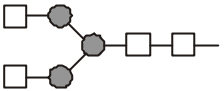
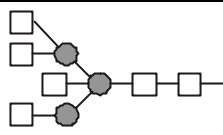
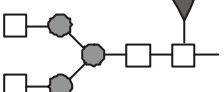
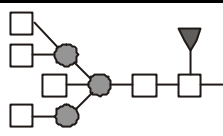
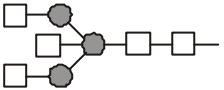
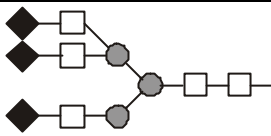
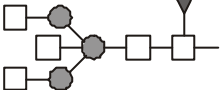
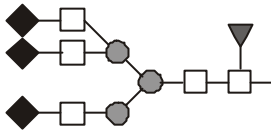
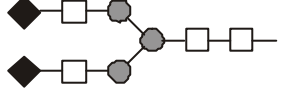
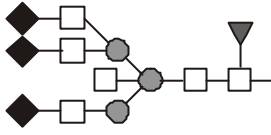
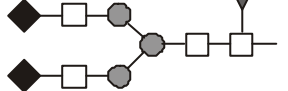
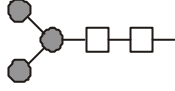
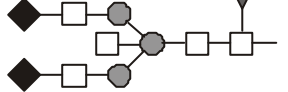
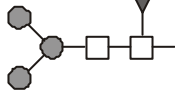
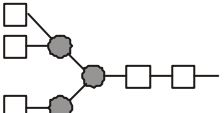
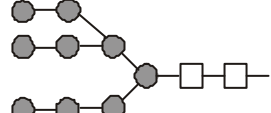
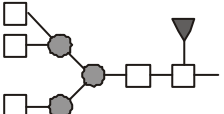
Um eine genauere Vorstellung von den im folgenden auftretenden Zuckerstrukturen zu bekommen, sind in Tab. 3-6 beispielhaft die wichtigsten der in BM-40 auftretenden Zuckerstrukturen, wie sie im weiteren Verlauf der Analyse ermittelt wurden, aufgeführt. Stellvertretend für Oligomannose-Glykane ist nur die Struktur des Oligomannose9-Zuckers dargestellt.

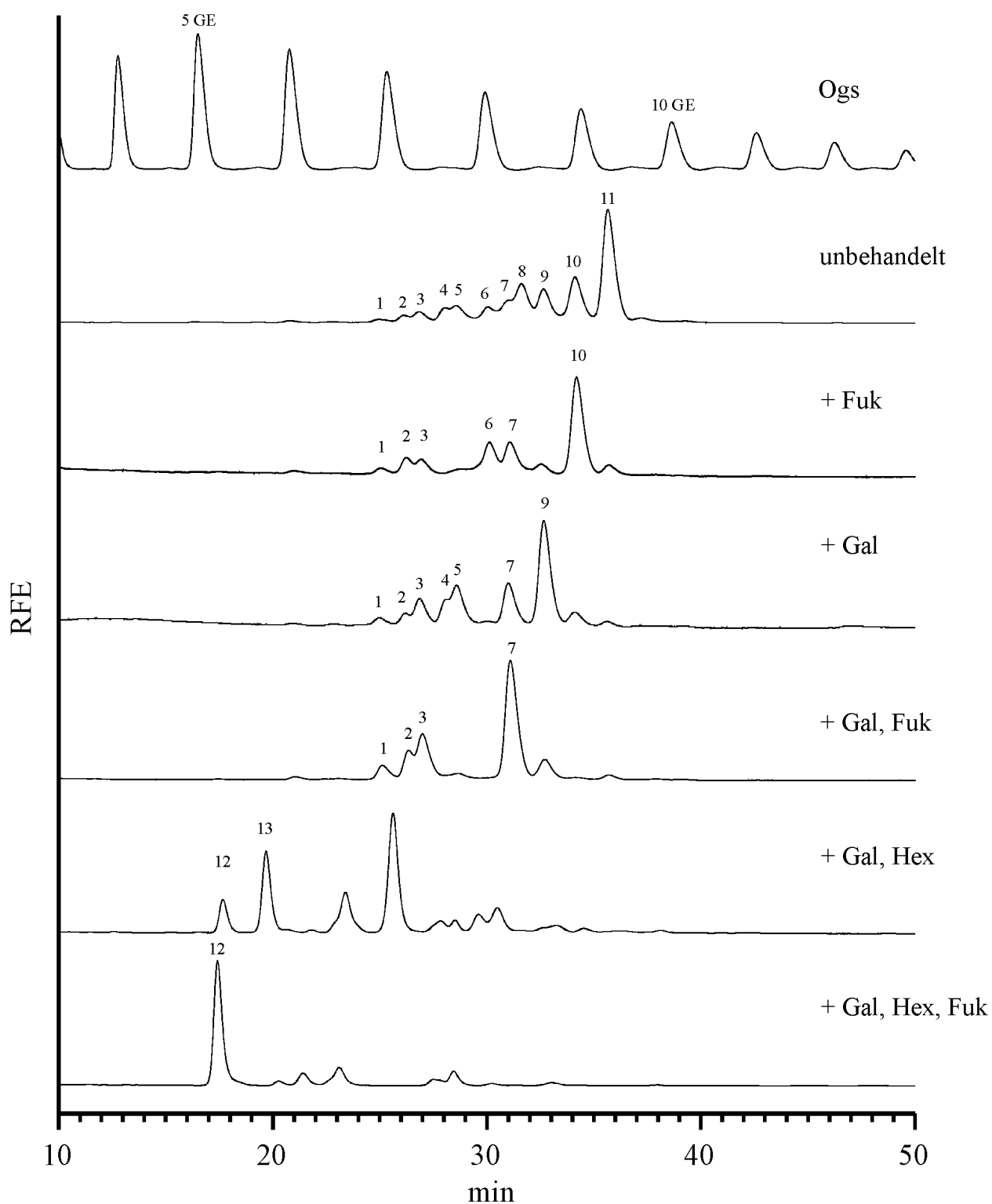
Die NP-HPLC-Profile der BM-40-N-Glykane sind in den Abbildungen 3-18 bis 3-24 aufgeführt, die daraus ermittelten Strukturen sind in den Tabellen 3-7 bis 3-12 zusammengefaßt.

Für die Untersuchung der N-Glykane von rekombinantem His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen wurden sowohl die N-Glykane aus der mannose-reichen stark bindenden Con A-Fraktion (Fraktion 2) verwendet, als auch die N-Glykane des Gesamtproteinpools ohne vorherige Trennung der Glykoformen mit Con A. Dies erleichterte die Identifizierung der Strukturen und eine Ermittlung der prozentualen Anteile der einzelnen Strukturen an der Gesamtmenge der bei diesem Protein vorhandenen N-Glykane.

**Tab. 3-6: Asialo N-Glykanstrukturen von BM-40**

Dargestellt sind einige der in BM-40 auftretenden N-Glykan-Strukturen und die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen. Stellvertretend für alle in BM-40 vorhandenen Oligomannose-Strukturen (Man5 bis Man9) ist nur die Oligomannose9-Struktur (Man9) gezeigt. □ = N-Acetylglucosamin, ● = Mannose, ◆ = Galaktose, ▼ = Fucose

Abkürzung	Struktur	Abkürzung	Struktur
A2G0		A3G0B	
A2G0F		A3G0FB	
A2G0B		A3G3	
A2G0FB		A3G3F	
A2G2		A3G3FB	
A2G2F		M3	
A2G2FB		M3F	
A3G0		Man9	
A3G0F			



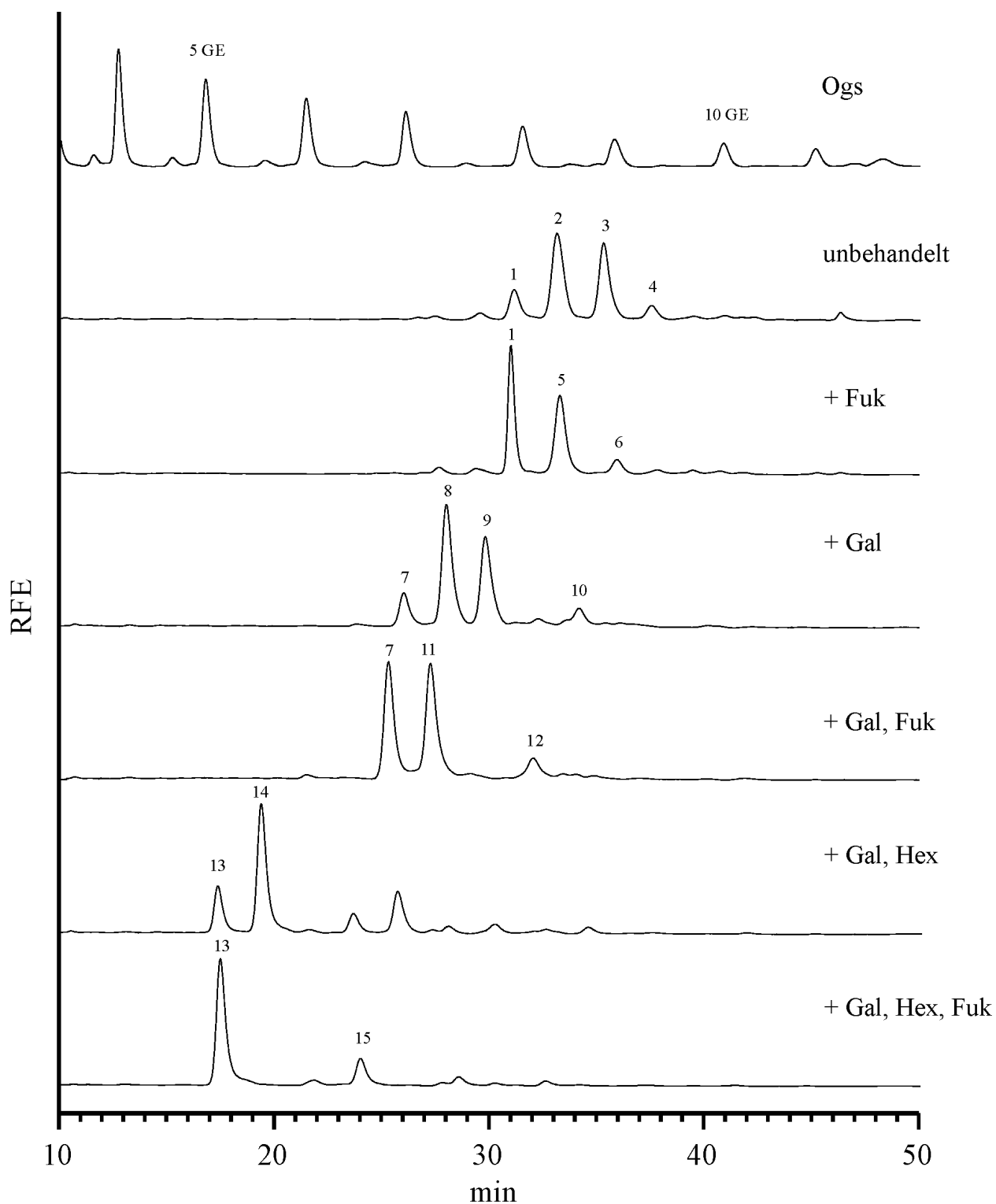
**Abb. 3-18: N-Glykane von asialo BM-40 aus EBNA-293-Zellen**

Dargestellt sind die NP-HPLC-Profile des Oligoglukosestandards (Ogs) und der sialidasebehandelten 2-AB-markierten N-Glykane nach Verdau mit spezifischen terminalen Glykosidasen (Fuk =  $\alpha$ -1,6-Fukosidase, Gal =  $\beta$ -Galaktosidase, Hex =  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase). Die Hauptpeaks sind numeriert und in Tab. 37 mit den zugeordneten Strukturen aufgeführt. Die zusätzlichen, nicht bezeichneten Peaks im Profil + Gal, Hex sind auf unvollständigen Abbau mit  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase zurückzuführen. (GE = Glukoseeinheiten)

**Tab. 3-7: N-Glykane von BM-40 aus EBNA-293-Zellen**

Aufgelistet sind die in Abb. 3-18 bezeichneten Peaks, die Glukoseeinheiten (GE), die zugeordneten Strukturen sowie die aus den Peakflächen berechneten prozentualen Anteile. Die Peaks 1 bis 11 repräsentieren die Strukturen der asialo N-Glykane, die übrigen treten erst als Abbauprodukte nach Verdau mit weiteren terminalen Glykosidasen auf.

Peak	GE	Struktur	%
1	6.9	A2G0	1
2	7.3	A2G0B	2
3	7.4	A3G0	3
4	7.6	A2G0FB	4
5	7.7	A3G0F	5
6	8.0	A3G1	4
7	8.2	A3G0B	6
8	8.35	A3G1F	11
9	8.6	A3G0FB	12
10	8.9	A3G1B	15
11	9.3	A3G1FB	37
12	5.2	M3	
13	5.6	M3F	



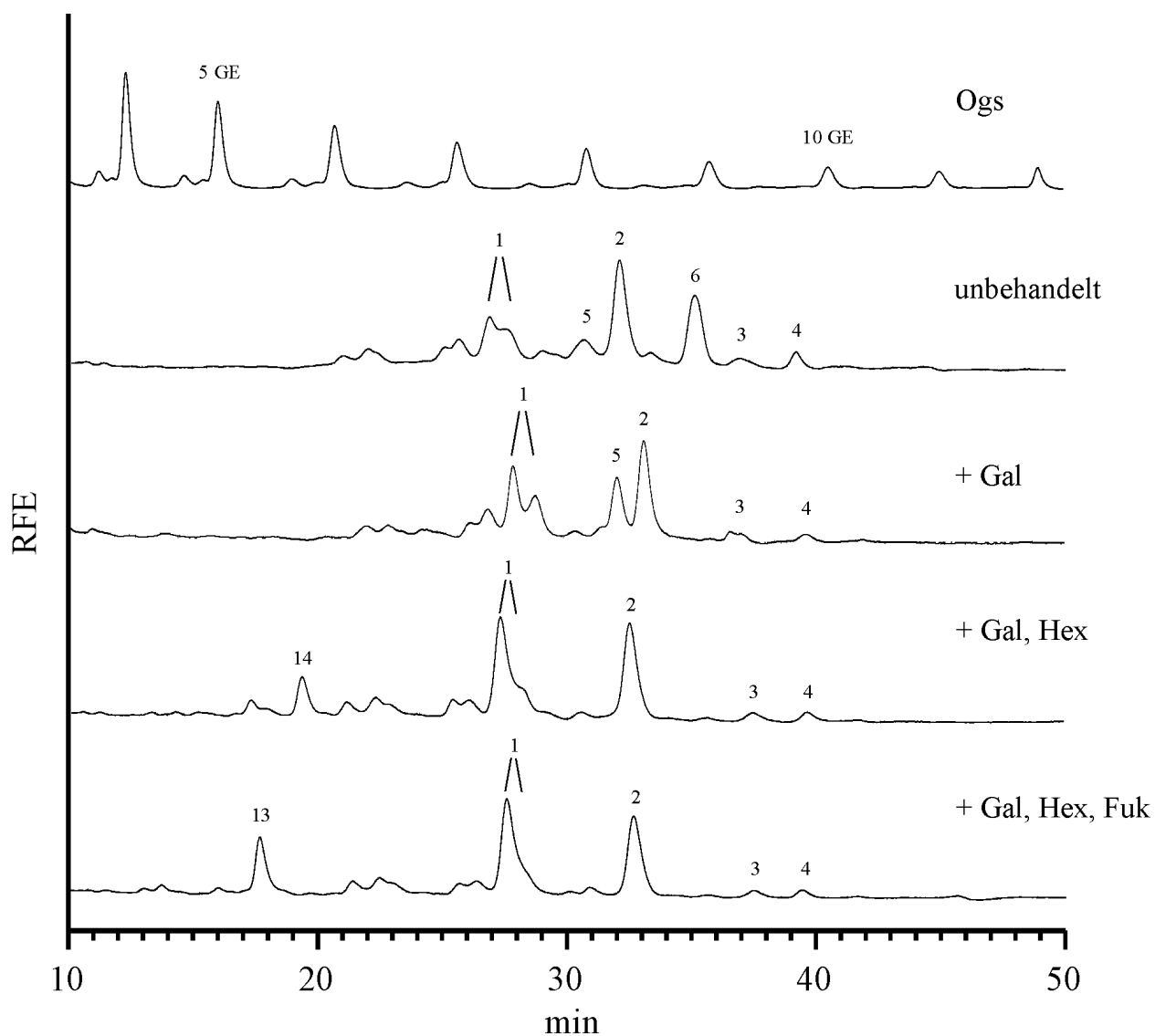
**Abb. 3-19: N-Glykane von asialo BM-40 aus SaOS-2-Zellen**

Dargestellt sind die NP-HPLC-Profile des Oligoglukosestandards (Ogs) und der sialidasebehandelten 2-AB-markierten N-Glykane nach Verdau mit spezifischen terminalen Glykosidasen (Fuk =  $\alpha$ -1,6-Fukosidase, Gal =  $\beta$ -Galaktosidase, Hex =  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase). Die Hauptpeaks sind nummeriert und in Tab. 38 mit den zugeordneten Strukturen aufgeführt. Der Unterschied in der Retentionszeit von Peak 7 in den Profilen + Gal bzw. + Gal, Fuk ist höchstwahrscheinlich auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen. (GE = Glukoseeinheiten)

**Tab. 3-8: N-Glykan-Analyse von BM-40 aus SaOS-2-Zellen**

Aufgelistet sind die in Abb. 3-19 bezeichneten Peaks, die Glukoseeinheiten (GE), die zugeordneten Strukturen sowie die aus den Peakflächen berechneten prozentualen Anteile. Die Peaks 1 bis 4 repräsentieren die Strukturen der asialo N-Glykane, die übrigen treten erst als Abbauprodukte nach Verdau mit weiteren terminalen Glykosidasen auf.

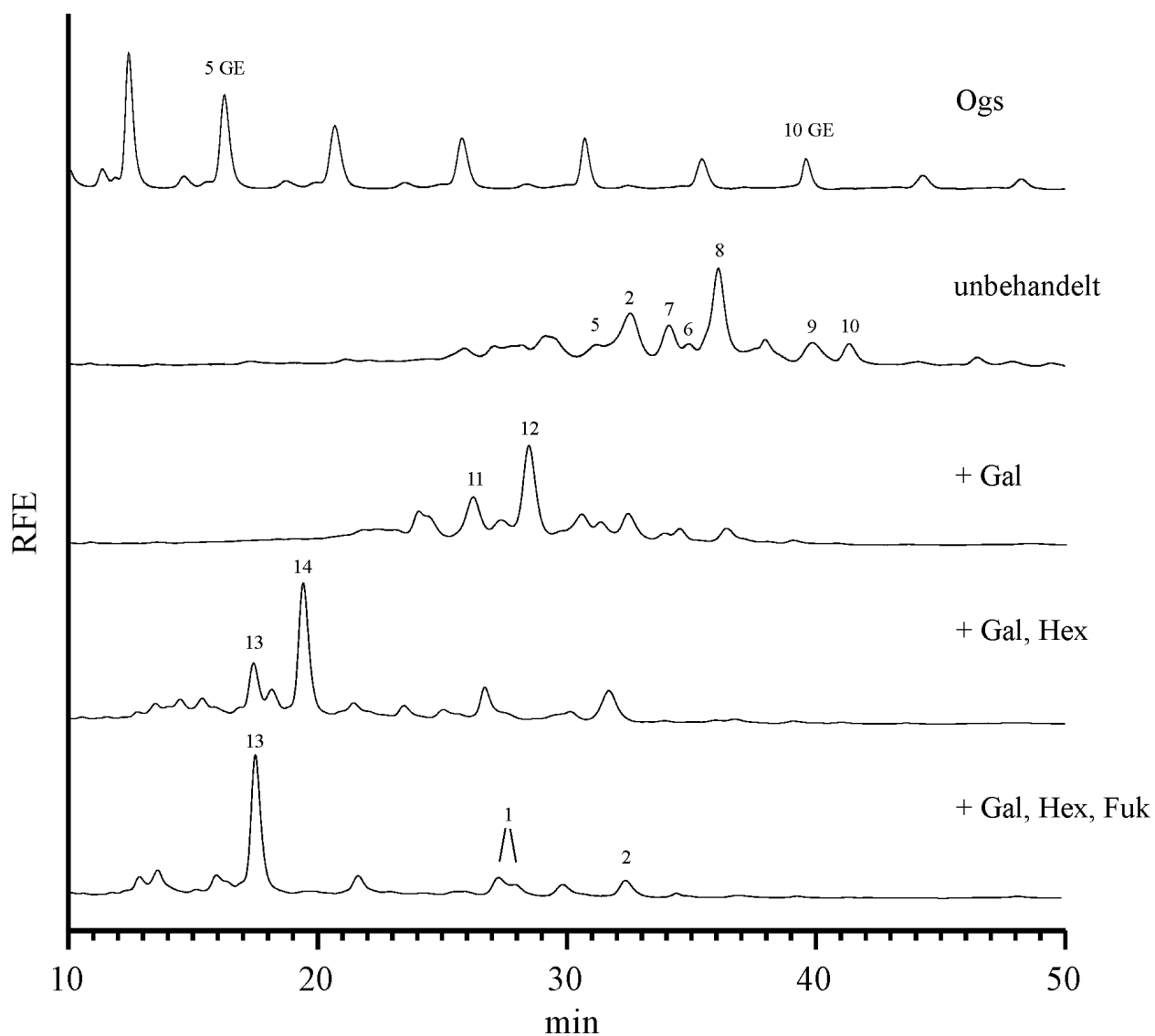
Peak	GE	Struktur	%
1	7.9	A2G1	13
2	8.35	A2G1F	46
3	8.85	A2G1FB	36
4	9.3	Hybrid (Man5F + 1 Gal + 1 GlcNac)	5
5	8.35	A2G1B	
6	9.0	Hybrid (Man5 + 1 Gal + 1 GlcNac)	
7	7.0	A2G0	
8	7.4	A2G0F	
9	7.7	A2G0FB	
10	8.6	Hybrid (Man5F + 1 GlcNac)	
11	7.3	A2G0B	
12	8.1	Hybrid (Man5 + 1 GlcNac)	
13	5.1	Man3	
14	5.6	Man3F	
15	6.7	Man5	



**Abb. 3-20: N-Glykane der mannosereichen ConA-Fraktion (500 mM Methylglukosid) von asialo BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen**

Dargestellt sind die NP-HPLC-Profil des Oligoglukosestandards (Ogs) und der sialidasebehandelten 2-AB-markierten N-Glykane nach Verdau mit spezifischen terminalen Glykosidasen (Fuk =  $\alpha$ -1,6-Fukosidase, Gal =  $\beta$ -Galaktosidase, Hex =  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase). Die Hauptpeaks sind numeriert und in Tab. 39 mit den zugeordneten Strukturen aufgeführt. Verwendet wurden die N-Glykane von BM-40 aus der 500 mM Methylglukosid ConA-Fraktion. (GE = Glukoseeinheiten)





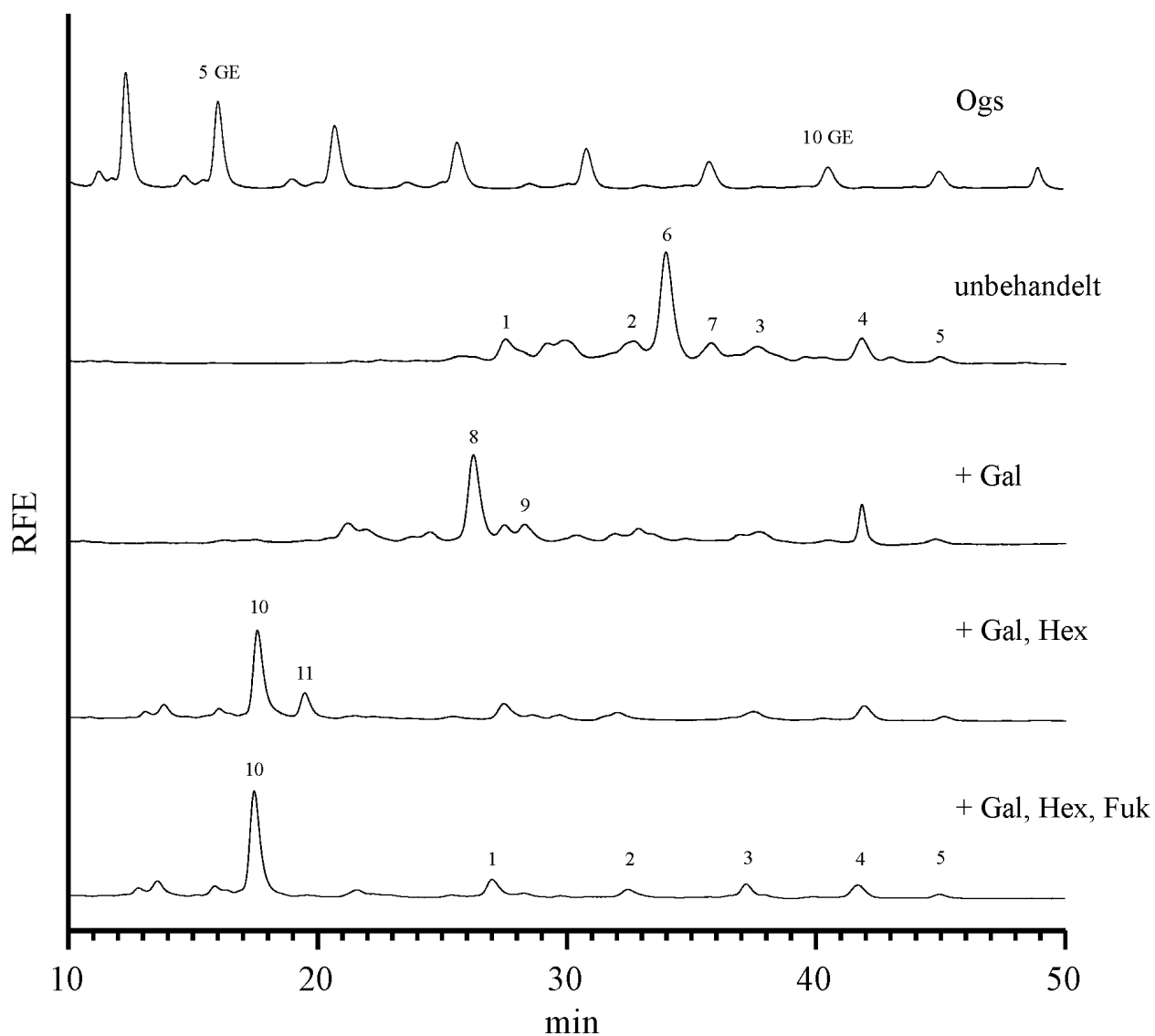
**Abb. 3-21: N-Glykane von asialo BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen**

Dargestellt sind die NP-HPLC-Profile des Oligoglucosestandards (Ogs) und der sialidasebehandelten 2-AB-markierten N-Glykane nach Verdau mit spezifischen terminalen Glykosidasen (Fuk =  $\alpha$ -1,6-Fukosidase, Gal =  $\beta$ -Galaktosidase, Hex =  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase). Die Hauptpeaks sind numeriert und in Tab. 39 mit den zugeordneten Strukturen aufgeführt. Verwendet wurden die N-Glykane aus dem Gesamtpool von MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40 ohne vorherige Trennung durch ConA-Affinitätschromatographie. (GE = Glukoseeinheiten)

**Tab. 3-9: N-Glykan-Analyse von BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen**

Aufgelistet sind die in Abb. 3-20 und 3-21 bezeichneten Peaks, die Glukoseeinheiten (GE), die zugeordneten Strukturen sowie die aus den Peakflächen berechneten prozentualen Anteile. Die Peaks 1 bis 10 repräsentieren die Strukturen der asialo N-Glykane, die übrigen treten erst als Abbauprodukte nach Verdau mit weiteren terminalen Glykosidasen auf.

Peak	GE	Struktur	%
1	7.1	Man5	8.5
2	8.2	Man6	12
3	9.1	Man7	1.5
4	9.9	Man8	2
5	8.0	Hybrid (Man5 + 1 GlcNac)	2
6	8.8	Hybrid (Man5 + 1 GlcNac + 1 Gal)	9
7	8.6	A2G2	10
8	9.1	A2G2F	38
9	10.0	A3G3	10
10	10.3	A3G3F	7
11	7.0	A2G0	
12	7.4	A2G0F	
13	5.1	M3	
14	5.6	M3F	



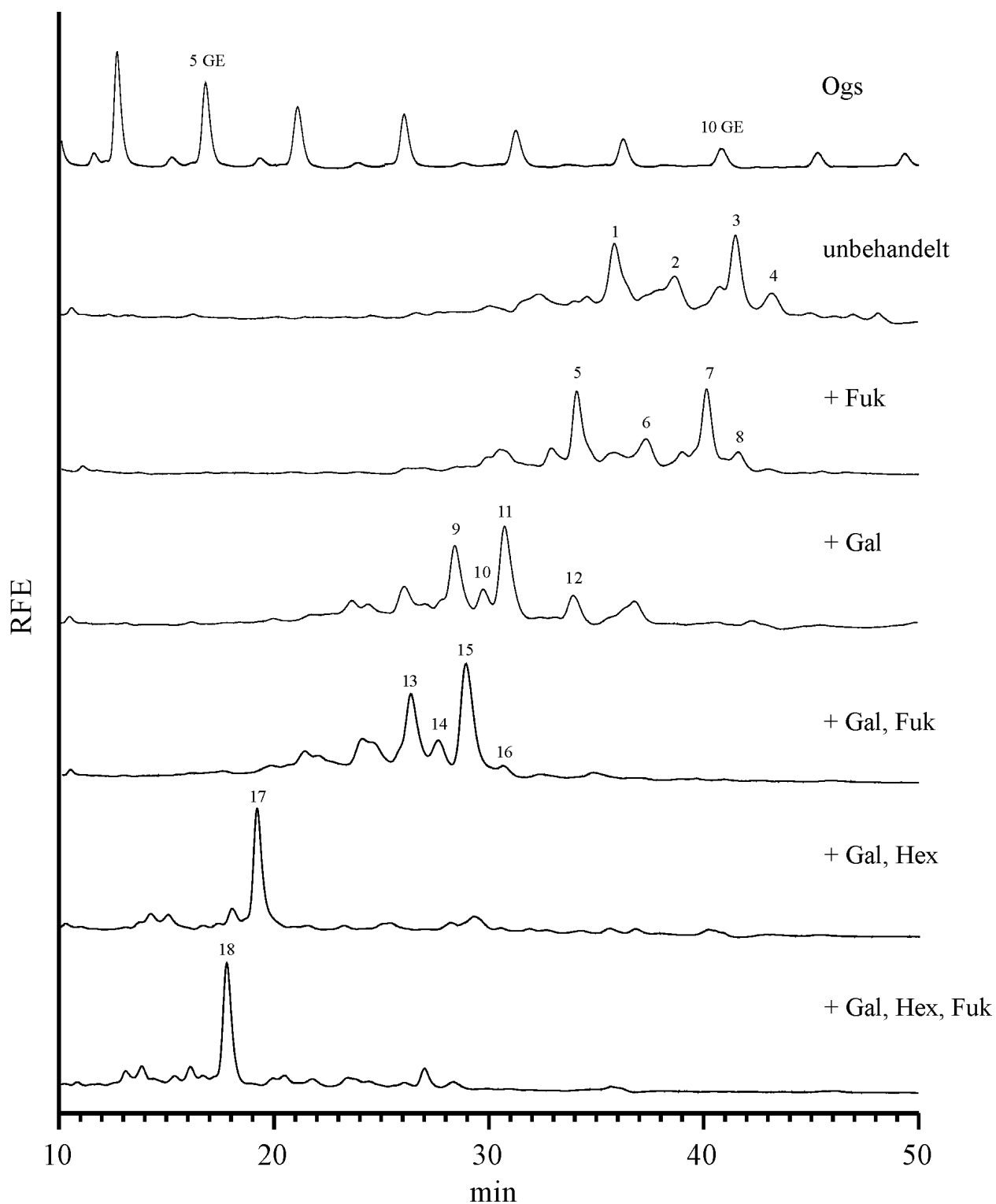
**Abb. 3-22: N-Glykane von asialo BM-40 aus humanem Knochen**

Dargestellt sind die NP-HPLC-Profile des Oligoglukosestandards (Ogs) und der sialidasebehandelten 2-AB-markierten N-Glykane nach Verdau mit spezifischen terminalen Glykosidasen (Fuk =  $\alpha$ -1,6-Fukosidase, Gal =  $\beta$ -Galaktosidase, Hex =  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase). Die Hauptpeaks sind numeriert und in Tab. 3-10 mit den zugeordneten Strukturen aufgeführt. (GE = Glukoseeinheiten)

**Tab. 3-10: N-Glykan-Analyse von BM-40 aus humanem Knochen**

Aufgelistet sind die in Abb. 322 bezeichneten Peaks, die Glukoseeinheiten (GE), die zugeordneten Strukturen sowie die aus den Peakflächen berechneten prozentualen Anteile. Die Peaks 1 bis 7 repräsentieren die Strukturen der asialo N-Glykane, die übrigen treten erst als Abbauprodukte nach Verdau mit weiteren terminalen Glykosidasen auf.

Peak	GE	Struktur	%
1	7.2	Man5	16
2	8.2	Man6	7
3	9.2	Man7	11
4	10.2	Man8	10
5	11	Man9	3
6	8.6	A2G2	45
7	8.9	A2G2F	8
8	7.0	A2G0	
9	7.4	A2G0F	
10	5.2	M3	
11	5.6	M3F	



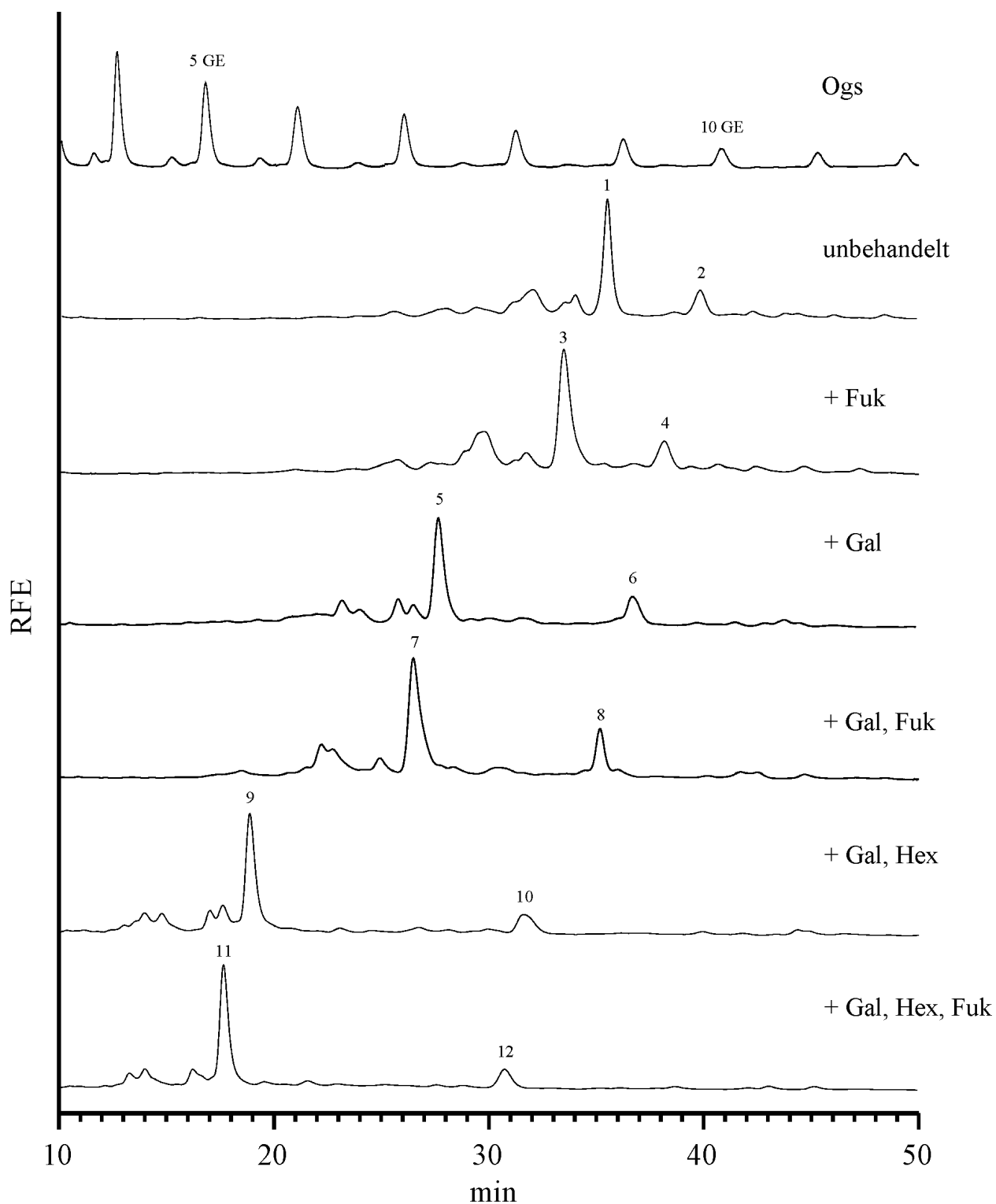
**Abb. 3-23: N-Glykane von asialo BM-40 aus humanen Blutplättchen**

Dargestellt sind die NP-HPLC-Profile des Oligoglukosestandards (Ogs) und der sialidasebehandelten 2-AB-markierten N-Glykane nach Verdau mit spezifischen terminalen Glykosidasen (Fuk =  $\alpha$ -1,6-Fukosidase, Gal =  $\beta$ -Galaktosidase, Hex =  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase). Die Hauptpeaks sind numeriert und in Tab. 3-11 mit den zugeordneten Strukturen aufgeführt. (GE = Glukoseeinheiten)

**Tab. 3-11: N-Glykan-Analyse von BM-40 aus humanen Blutplättchen**

Aufgelistet sind die in Abb. 3-23 bezeichneten Peaks, die Glukoseeinheiten (GE), die zugeordneten Strukturen sowie die aus den Peakflächen berechneten prozentualen Anteile. Die Peaks 1 bis 4 repräsentieren die Strukturen der asialo N-Glykane, die übrigen treten erst als Abbauprodukte nach Verdau mit weiteren terminalen Glykosidasen auf.

Peak	GE	Struktur	%
1	8.9	A2G2F	27
2	9.5	A2G2FB	20
3	10.2	A3G3F	43
4	10.5	A3G3FB	10
5	8.5	A2G2	
6	9.2	A2G2B	
7	9.8	A3G3	
8	10.2	A3G3B	
9	7.4	A2G0F	
10	7.7	A2G0FB	
11	7.9	A3G0F	
12	8.5	A3G0FB	
13	7.0	A2G0	
14	7.3	A2G0B	
15	7.5	A3G0	
16	7.8	A3G0B	
17	5.5	M3F	
18	5.2	M3	



**Abb. 3-24: N-Glykane von asialo BM-40 aus Maus-EHS-Tumor**

Dargestellt sind die NP-HPLC-Profile des Oligoglukosestandards (Ogs) und der sialidasebehandelten 2-AB-markierten N-Glykane nach Verdau mit spezifischen terminalen Glykosidasen (Fuk =  $\alpha$ -1,6-Fukosidase, Gal =  $\beta$ -Galaktosidase, Hex =  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase). Die Hauptpeaks sind numeriert und in Tab. 3-12 mit den zugeordneten Strukturen aufgeführt. (GE = Glukoseeinheiten)

**Tab. 3-12: N-Glykan-Analyse von BM-40 aus Maus EHS -Tumor**

Aufgelistet sind die in Abb. 324 bezeichneten Peaks, die Glukoseeinheiten (GE), die zugeordneten Strukturen sowie die aus den Peakflächen berechneten prozentualen Anteile. Die Peaks 1 und 2 repräsentieren die Strukturen der asialo N-Glykane, die übrigen treten erst als Abbauprodukte nach Verdau mit weiteren terminalen Glykosidasen auf.

Peak	GE	Struktur	%
1	8.8	A2G2F	80
2	9.8	Hybrid (Man5FB + 1 GlcNac + 1 Gal)	20
3	8.4	A2G2	
4	9.3	Hybrid (Man5B + 1 GlcNac + 1 Gal)	
5	7.2	A2G0F	
6	9.0	Hybrid (Man5FB + 1 GlcNac)	
7	6.9	A2G0	
8	8.6	Hybrid (Man5B + 1 GlcNac)	
9	5.5	Man3F	
10	8.0	Man5FB	
11	5.1	Man3	
12	7.8	Man5B	

Die Ergebnisse der durchgeführten N-Glykan-Analyse zeigen, daß BM-40 aus allen in dieser Arbeit verwendeten Quellen komplexe N-Glykan-Strukturen aufweist. EBNA-293-BM-40 und Blutplättchen-BM-40 besitzen ausschließlich komplexe N-Glykane, die durch sequenziellen Abbau auf die Pentasaccharid-Grundstruktur reduziert werden konnten. SaOS-2-BM-40, MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40 und EHS-BM-40 enthielten zusätzlich N-Glykane vom Hybrid-Typ, bei denen ein Abbau bis zum Oligomannose5-Glykan möglich war. In allen Fällen lag dabei ein biantennäres Glykan vor, bei dem eine Antenne höchstwahrscheinlich noch zwei Mannose-Reste trug, während die andere Antenne aus mindestens noch einem N-Acetylglukosamin (GlcNac) und eventuell einem Galaktose-Rest bestand. Das Hybrid-Glykan des MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40 enthielt im Gegensatz zu den Hybrid-Glykanen der anderen beiden Proteine keine core-Fukose. Nur BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen und aus humanem Knochen wies Oligomannose-Glykane auf, die durch Verdau mit den verwendeten



terminalen Glykosidase nicht weiter abgebaut werden konnten. Alle untersuchten BM-40-Proteine enthielten in unterschiedlichen Anteilen core-fukosylierte N-Glykane, wobei der Anteil bei Blutplättchen-BM-40 und EHS-BM-40 am höchsten (100 %) und bei Knochen-BM-40 am niedrigsten (8 %) war. Das Abtrennen eines Fukose-Restes bewirkte eine Verringerung der Glukoseeinheiten um 0.4 bis 0.5. BM-40 aus Blutplättchen, EBNA-293-Zellen und SaOS-2-Zellen besitzt N-Glykane, die ein N-Acetylglukosamin in „bisecting“-Position tragen. Triantennäre N-Glykan-Strukturen findet man in BM-40 aus EBNA-293-Zellen (93 %), Blutplättchen (53 %) und MHH-ES-1-Zellen (17 %). In BM-40 aus den übrigen untersuchten Quellen (humaner Knochen, SaOS-2-Zellen, Maus-EHS-Tumor) treten nur biantennäre Strukturen auf. Auffällig ist, daß in BM-40 aus EBNA-293-Zellen und SaOS-2-Zellen lediglich unvollständig galaktosylierte komplexe N-Glykan-Strukturen zu finden sind. EBNA-293-BM-40 weist nur N-Glykane auf, die keine bzw. nur eine terminale Galaktose pro bi- bzw. triantennärem Glykan tragen. Die N-Glykane von SaOS-2-BM-40 tragen stets eine terminale Galaktose pro biantennärer Zuckerstruktur. Bei allen anderen untersuchten BM-40-Proteinen (aus MHH-ES-1-Zellen, Knochen, Blutplättchen und Maus-EHS-Tumor) wurden nur vollständig galaktosylierte N-Glykane beobachtet.

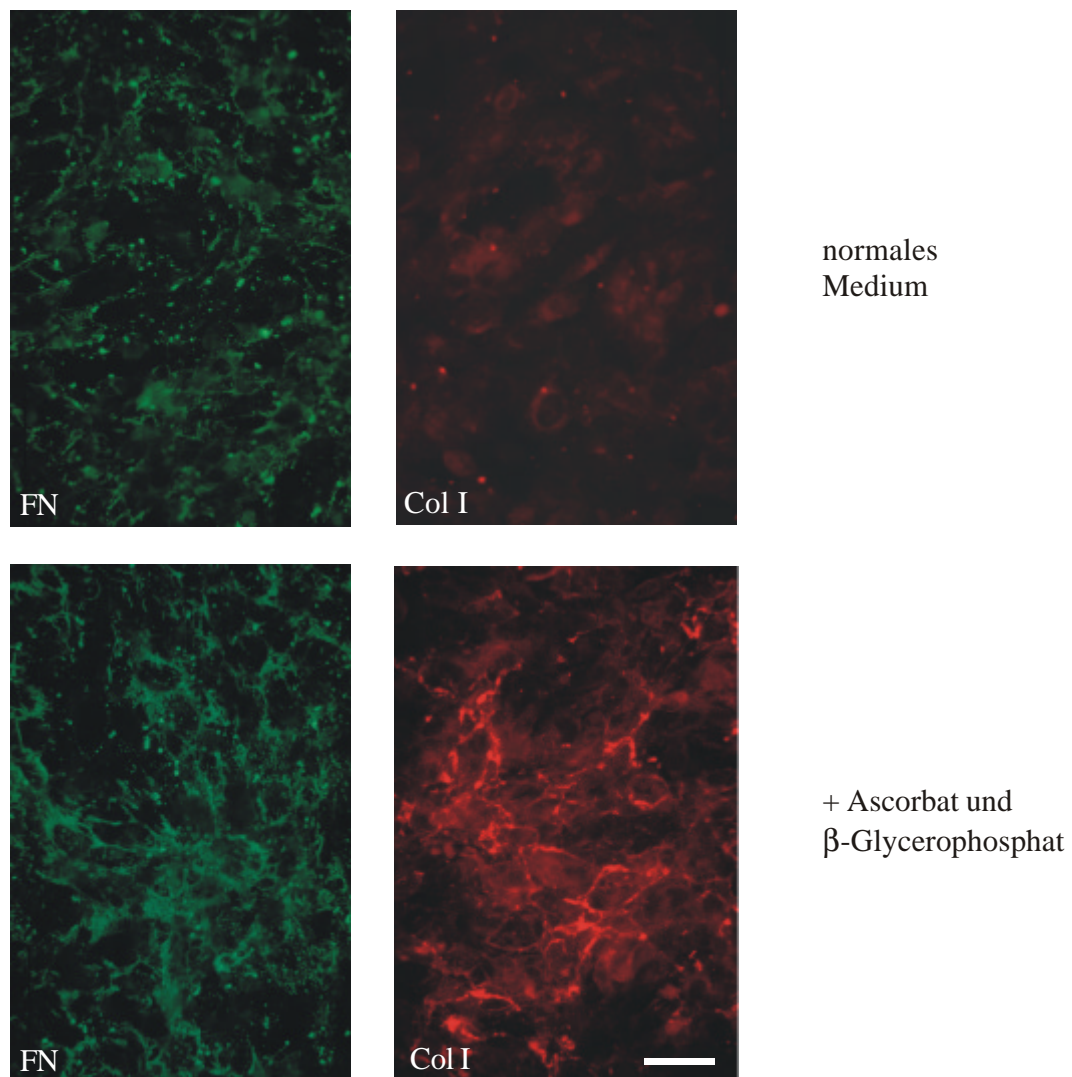
In den NP-HPLC-Profilen von Blutplättchen-BM-40, Knochen-BM-40, EHS-Tumor-BM-40 und MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40 findet man mehr oder weniger stark ausgeprägt zu Beginn des Profils vier bis fünf kleine Peaks, die durch Abbau mit terminalen Glykosidasen zu geringeren Werten hin verschoben wurden. Bei vollständigem Abbau befanden sie sich im Profil bei Werten zwischen vier und fünf Glukoseeinheiten, also noch vor der allen N-Glykanen gemeinsamen Pentasaccharid-Grundstruktur (5.2 Glukoseeinheiten). Da N-Glykane mit den verwendeten Glykosidasen nicht weiter als bis zu dieser Grundstruktur abgebaut werden können, konnten diese Signale nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Signalen um Artefakte. Weiterhin sind bei SaOS-2-BM-40 und EBNA-293-BM-40 in den Profilen der mit  $\beta$ -Galaktosidase und  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase verdauten Proben zusätzliche Peaks zu sehen, die auf unvollständigen Verdau mit  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase zurückzuführen sind.

Die Hybrid-Struktur des EHS-BM-40 ist bei jeder Verdau-Stufe etwa 0.3 – 0.5 Glukoseeinheiten größer als das vergleichbare Glykan des SaOS-2-BM-40. Die Anzahl der N-Acetylglukosamine und der Galaktose-Reste (jeweils eins) konnte recht genau bestimmt werden. Auch sollte der andere Ast nach der Theorie nicht mehr als zwei Mannose-Reste tragen. Aus diesem Grund vermute ich, daß das Hybrid-Glykan vom EHS-BM-40 noch ein „bisecting“-N-Acetylglukosamin besitzt. Dieses verursacht bei Vorhandensein im allgemeinen eine Erhöhung um 0.3 bis 0.4 Glukoseeinheiten. Dieses GlcNAc sollte eigentlich bei vollständigem

Verdau mit  $\beta$ -Galaktosidase,  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase und  $\alpha$ -1,6-Fukosidase entfernt werden, was jedoch, wenn man sich die Glukoseeinheit des entsprechend verdauten Glykans (7.8 gegenüber 7.1 bis 7.3 bei einem Man5-Glykan) offensichtlich nicht der Fall war. Da jedoch die  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase auch in anderen Fällen, wie bereits erwähnt, und insbesondere in Fällen, wo ein „bisecting“ GlcNAc vorlag, Glykane nur unvollständig verdaute, vermute ich, daß das auch hier die Erklärung ist. Außerdem trägt dieses Hybrid-Glykan auf dem einen Ast noch zwei Mannose-Reste, die möglicherweise die Zugänglichkeit der „bisecting“ Position für die  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase zusätzlich erschweren.

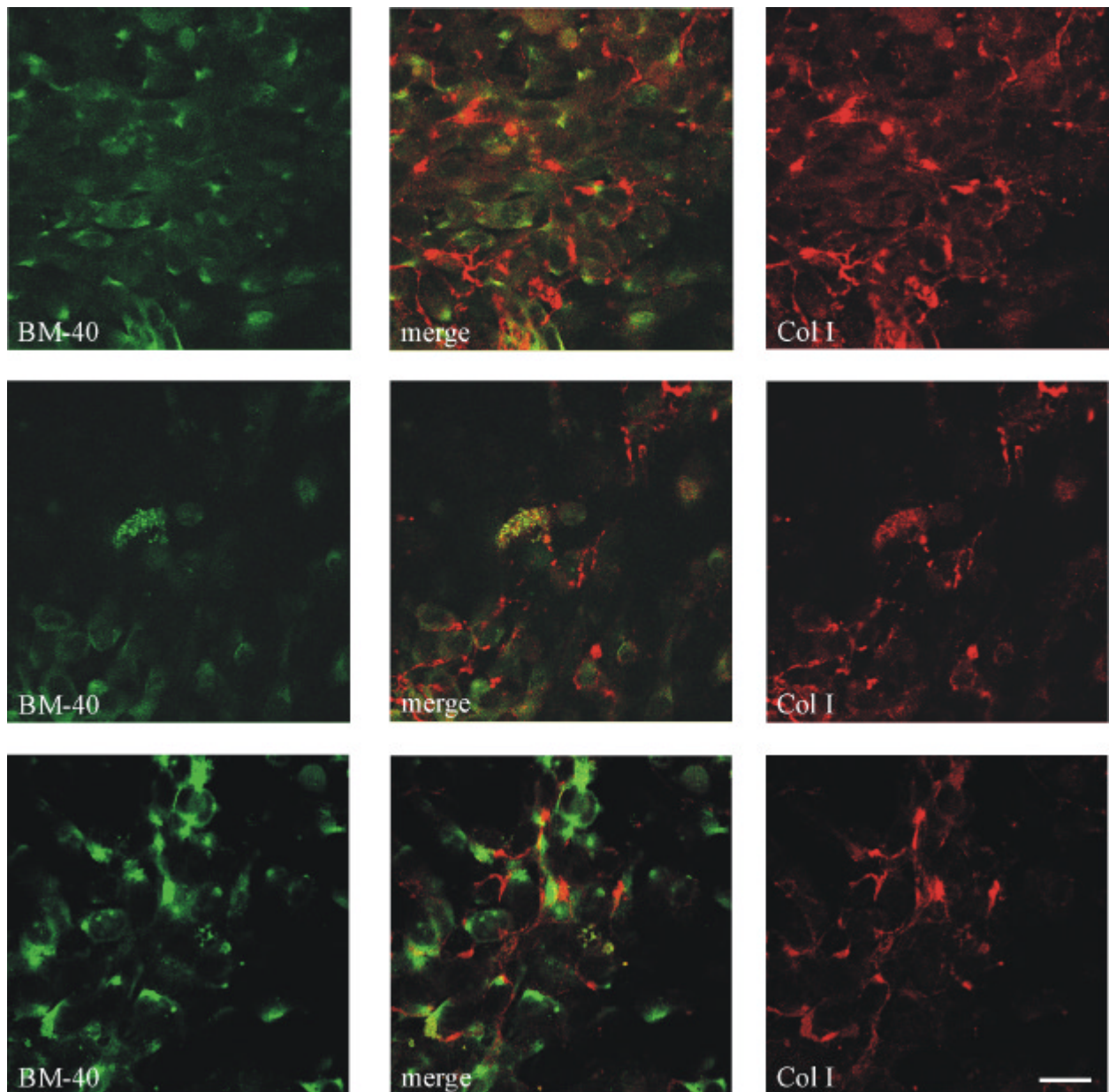
### 3.9 Zellkulturmodell für eine mineralisierte Matrix

Aus früheren Studien (McQuillan et al., 1995) ist bekannt, daß die humane Osteosarkom-Zelllinie SaOS-2 unter Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat eine mineralisierte Extrazellulärmatrix bilden. Diese Zelllinie wurde daher auch hier als *in vitro* Modell einer mineralisierten Knochenmatrix verwendet. In diesem Zellkulturmodell sollte die Lokalisation von BM-40 in der Extrazellulärmatrix untersucht werden. In früheren Studien wurde eine Bindung von BM-40 an verschiedene Kollagene, unter anderem Kollagen I, und Hydroxylapatit beschrieben (Termine et al., 1981). Man kann also vermuten, daß BM-40 entweder an Hydroxylapatit gebunden, Kollagen-assoziiert oder als Teil eines anderen Netzwerks vorliegt. Humane Osteosarkom-Zellen (SaOS-2-Zellen) wurden mehrere Tage postkonfluent unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen und täglichem Mediumwechsel kultiviert. Um die Ausbildung einer mineralisierten Matrix zu ermöglichen, wurde das Medium mit 0.25 mM Ascorbat und 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat supplementiert. Die Entwicklung einer Extrazellulärmatrix wurde in Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Hilfe eines gegen Kollagen-I und eines gegen Fibronectin gerichteten Antikörpers überprüft. SaOS-2-Zellen zeigten nach Kultivierung mit normalem Medium ein Fibronectin-Netzwerk und vereinzelte Kollagen I-Signale. Erst nach Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat entwickelte sich ein deutlich ausgeprägtes Kollagen I-Netzwerk, auch die Fibronectin-Färbung war intensiver (Abb. 3-25).



**Abb. 3-25: Immunfluoreszenzfärbung von Fibronectin (FN) und Kollagen I (Col I) in der extrazellulären Matrix von SaOS-2-Zellen**

Die Zellen wurden mehrere Tage mit normalem Medium bzw. unter Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat kultiviert. Die Detektion von Fibronectin erfolgte jeweils mit einem polyklonalen Primärantikörper und einem DTAF-konjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper, die Detektion von Kollagen I erfolgte mit einem monoklonalen Primärantikörper sowie einem Cy3-konjugierten  $\alpha$ -Maus-IgG-Antikörper. Der Balken entspricht 30  $\mu\text{m}$ .

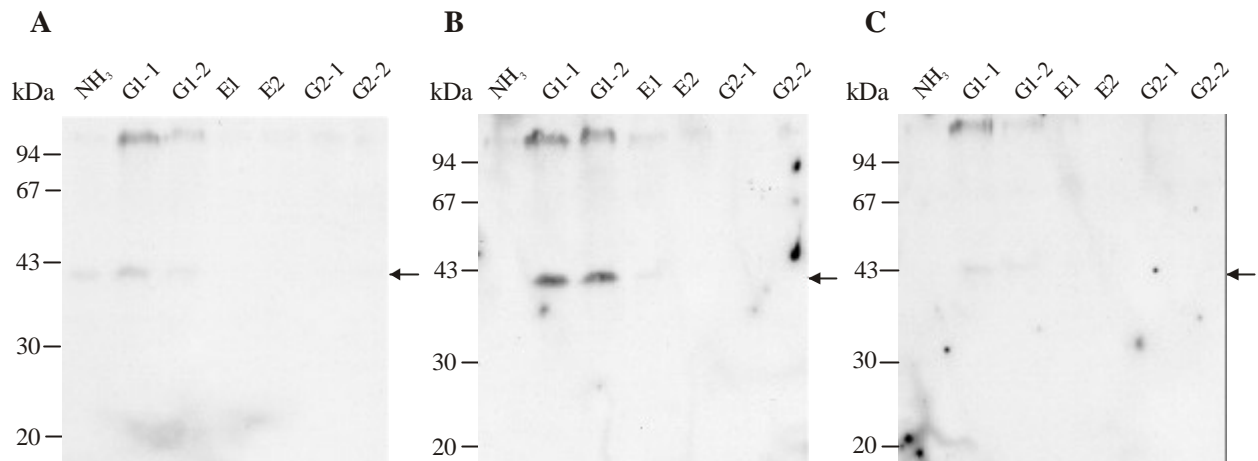


**Abb. 3-26: Immunfluoreszenzfärbung von BM-40 und Kollagen I (Col I) in der extrazellulären Matrix von SaOS-2-Zellen**

Die Zellen wurden mehrere Tage unter Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat kultiviert. Die Detektion von BM-40 erfolgte mit einem polyklonalen Primärantikörper und mit einem DTAF-konjugierten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper, die Detektion von Kollagen I erfolgte mit einem monoklonalen Primärantikörper sowie einem Cy3-konjugierten  $\alpha$ -Maus-IgG-Antikörper. Die Abbildungen wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscannmikroskops aufgenommen. Der Balken entspricht 15  $\mu$ m.

In Immunfluoreszenzfärbungen von SaOS-2-Zellen wurde anschließend die Lokalisation von BM-40 und eine eventuelle Colokalisation mit Kollagen I untersucht. Aus Bindungsstudien ist bekannt, daß BM-40 an Kollagen I binden kann. Um dabei extra- von intrazellulären Signalen zu unterscheiden, wurden sowohl nicht-permeabilisierte als auch permeabilisierte Zellen gefärbt. Die Ergebnisse der nicht-permeabilisierten Zellen, welche die extrazelluläre Lokalisation zeigen, sind in Abb. 3-26 dargestellt. Im Fall der permeabilisierten Zellen wurde eine komplette Färbung der gesamten Zellen beobachtet (nicht gezeigt). BM-40 ist in der Extrazellulärmatrix von SaOS-2-Zellen detektierbar. Das Protein zeigt dabei jedoch entgegen den Erwartungen sowohl in konfluenten als auch in Bereichen mit einer geringeren Zelldichte nur eine geringe Colokalisation mit Kollagen I (Abb. 3-26). Allerdings schienen Bereiche mit einer starken Kollagen I-Expression auch eine hohe BM-40-Expression aufzuweisen.

Um die Lokalisation von BM-40 in der Matrix von osteoblastenähnlichen Zellen eingehender zu untersuchen, wurden SaOS-2-Zellen 1 bis 3 Wochen postkonfluent unter verschiedenen Bedingungen (mit und ohne Supplement) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 0.5 M Ammoniak extrahiert, die extrazelluläre Matrix von den Kulturschalen abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation und Abnahme des Ammoniak-Überstandes blieb die extrazelluläre Matrix im Reaktionsgefäß zurück. Diese wurde sequenziell jeweils zweimal mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid, 0.5 M EDTA und erneut 4 M Guanidiniumhydrochlorid extrahiert. Die Extrakte wurden gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, dialysiert, TCA-gefällt und nach Aufnahme in reduzierendem Probenpuffer mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von BM-40 erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpers gegen bovines BM-40 (AON-1) im Immunoblot. In den Extrakten von SaOS-2-Zellen, die eine Woche lang postkonfluent kultiviert worden waren, konnten in keiner der beschriebenen Fraktionen BM-40 Signale detektiert werden. Nach zwei bzw. drei Wochen Kultivierung waren dagegen BM-40-Signale nachweisbar (Abb. 3-27 und 3-28).

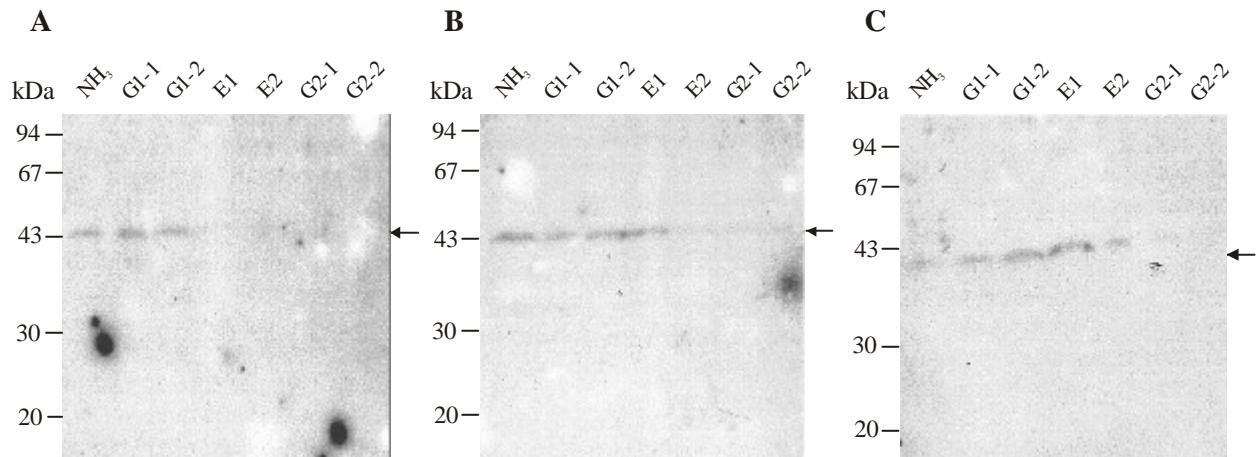


**Abb. 3-27: Extraktion von BM-40 aus extrazellulärer Matrix von SaOS-2-Zellen nach zwei Wochen Kultivierung**

Immunoblot mit monoklonalem  $\alpha$ -BM-40-Antikörper

SaOS-2-Zellen wurden über 2 Wochen mit verschiedenen Bedingungen kultiviert und Zellen bzw. Matrix in verschiedenen Schritten extrahiert (Überstand der Ammoniak-Extraktion = NH<sub>3</sub>, Guanidiniimhydrochlorid-Extrakte = G, EDTA-Extrakte = E). Die Extrakte wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Der Pfeil kennzeichnet die Laufhöhe der BM-40-Bande.

A: normales Medium, B: + Ascorbat, C: + Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat



**Abb. 3-28: Extraktion von BM-40 aus extrazellulärer Matrix von SaOS-2-Zellen nach drei Wochen Kultivierung**

Immunoblot mit monoklonalem  $\alpha$ -BM-40-Antikörper

SaOS-2-Zellen wurden über 3 Wochen mit verschiedenen Bedingungen kultiviert und Zellen bzw. Matrix in verschiedenen Schritten extrahiert (Überstand der Ammoniak-Extraktion = NH<sub>3</sub>, Guanidiniimhydrochlorid-Extrakte = G, EDTA-Extrakte = E). Die Extrakte wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Der Pfeil kennzeichnet die Laufhöhe der BM-40-Bande.

A: normales Medium, B: + Ascorbat, C: + Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat

Nach zwei Wochen postkonfluenter Kultivierung (Abb. 3-27) wurde BM-40 lediglich schwach im Ammoniaküberstand und etwas stärker in den ersten beiden Guanidiniumhydrochlorid-Extrakten gefunden, d.h. zu diesem Zeitpunkt ist bei allen getesteten Kultivierungsbedingungen BM-40 an die Extrazellulärmatrix gebunden. Die stärksten Signale waren bei Kultivierung mit Ascorbat nachweisbar. Im Immunoblot sind zusätzlich zu den Signalen auf der normalen Laufhöhe von BM-40 hochmolekulare Signale ( $> 94$  kDa) zu erkennen (Abb. 3-27). Möglicherweise handelt es sich dabei um  $\gamma$ -Glutamyl- $\gamma$ -Lysin verknüpfte BM-40-haltige Komplexe. Aus früheren Studien ist bekannt, daß BM-40 ein Substrat für solche Transglutaminase-katalysierten Verknüpfungsreaktionen ist (Aeschlimann et al., 1995).

Nach drei Wochen postkonfluenter Kultivierung unter Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat ist BM-40 zusätzlich in den EDTA-Extrakten nachweisbar (Abb. 3-28), d.h. BM-40 wird erst spät in die mineralisierte Matrix eingebaut. Wie erwartet sind bei Kultivierung mit normalem Medium nur BM-40-Signale im Ammoniaküberstand und in den ersten beiden Guanidiniumhydrochlorid-Extrakten detektierbar, jedoch nicht mehr in den EDTA-Extrakten. Dies bestätigt das *in vitro* Modell, da ohne Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat auch keine mineralisierte Matrix gebildet werden kann.

## 4 Diskussion

Das extrazelluläre Matrixprotein BM-40 tritt, soweit bisher bekannt, in zwei unterschiedlich glykosylierten Isoformen auf. BM-40 besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, Asn 71 und Asn 99 (Bolander et al., 1988; Villareal et al., 1989), von denen nach bisherigen Erkenntnissen nur Asn 99 verwendet wird (Xie and Long, 1995; Hohenester et al. 1997). O-Glykosylierungen sind für BM-40 nicht bekannt. Kelm und Mann (1991) berichteten, daß BM-40 aus humanem Knochen eine N-Glykosylierung vom Oligomannose-Typ trägt, während humane Blutplättchen das Protein mit einer komplexen N-Glykosylierung exprimieren. In der gleichen Studie wurden Unterschiede in der Kollagen-Bindung für Knochen- und Blutplättchen-BM-40 beschrieben. Humanes Knochen-BM-40 zeigte deutliche Bindung an Kollagen I, III und V, während für humanes Blutplättchen-BM-40 keine signifikante Bindung detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse weisen auf verschiedene biologische Funktionen der beiden Glykoformen hin.

Die Unterschiede in der Oligosaccharid-Struktur von Knochen- und Blutplättchen-BM-40 könnten auch für die Diagnostik von Bedeutung sein. Beispielsweise könnte BM-40 als Marker für Knochenstoffwechselerkrankungen verwendet werden, indem man versucht, ausgehend von Unterschieden im Glykosylierungsmuster, den Ursprung des messbaren BM-40 in Patientenblutproben zu identifizieren und auf diese Weise Knochen-BM-40 von Blutplättchen-BM-40 zu unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch rekombinante Expression der beiden Glykoformen und Analyse der N-Glykan-Strukturen von rekombinantem und aus Gewebe isoliertem BM-40 die Voraussetzungen geschaffen werden, um ein solches diagnostisches Testsystem aufzubauen und um die postulierten funktionellen Unterschiede zu überprüfen.

### 4.1 Isolierung von BM-40 aus verschiedenen Quellen

Beide BM-40-Varianten sollten rekombinant exprimiert werden und mit aus Gewebe gereinigtem Protein verglichen werden. Dazu wurden erst verschiedene Zelllinien hinsichtlich des Glykosylierungstyp des endogenen BM-40 untersucht, indem serumfreier Überstand dieser Zelllinien mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H behandelt und die Spaltprodukte mittels



SDS-PAGE analysiert wurden. N-Glykosidase F schneidet grundsätzlich alle N-Glykane, während nur N-Glykane vom Oligomannose- bzw. Hybrid-Typ Endoglykosidase H-sensitiv sind. Eine positive Reaktion wurde durch eine Veränderung des Laufverhaltens in der SDS-PAGE angezeigt. Da bereits bekannt war, daß die humane embryonale Nierenzelllinie 293 BM-40 mit einem komplexen und damit eher blutplättchen-ähnlichen N-Glykosylierungstyp exprimiert (Nischt et al., 1991), wurde nach einer Zelllinie gesucht, die eine knochen-ähnliche BM-40-Glykoform exprimiert. Daher wurden in erster Linie Osteosarkom-Zelllinien bzw. Zelllinien, die einen osteoblasten-ähnlichen Phänotyp besitzen, getestet. Alle untersuchten Zelllinien sekretierten BM-40 mit einer komplexen N-Glykosylierung. Lediglich die humane Osteosarkom-Zelllinie MHH-ES-1 sekretierte BM-40, das zumindest teilweise Endoglykosidase H-sensitiv und daher knochen-ähnlich war.

Anschließend erfolgte die rekombinante Expression von humanem BM-40 in drei verschiedenen Zelllinien. Die rekombinante Expression von BM-40 erfolgte jeweils in eukaryotischen Expressionssystemen, um möglichst eine native Konformation der Proteine zu gewährleisten. Die humane embryonale Nierenzelllinie EBNA-293 wurde für die Herstellung von rekombinantem BM-40 mit komplexer N-Glykosylierung und damit für die Expression von BM-40 vom Blutplättchen-Typ verwendet. Die humane Osteosarkom-Zelllinie MHH-ES-1 wurde für die Herstellung von rekombinantem BM-40 vom Knochen-Typ ausgewählt. Ausserdem erfolgte die rekombinante Expression von BM-40 in der humanen Osteosarkom-Zelllinie SaOS-2, obwohl aus eigenen Untersuchungen des endogenen Proteins sowie aus früheren Studien (Kelm et al., 1992) bekannt war, daß diese Zelllinie BM-40 mit einer komplexen und daher nicht knochen-ähnlichen N-Glykosylierung sekretiert. Diese Zelllinie gilt jedoch als osteoblasten-ähnlich, da sie verschiedene typische Osteoblastenmarker exprimiert (Murray et al., 1987; Fukayama et al., 1988; Villareal et al., 1989; Ikeda et al., 1990) und wird in der Literatur häufig als Modell für die Untersuchung von Osteoblasten-Funktionen angewendet. Da auch in dieser Arbeit ein auf SaOS-2-Zellen beruhendes Modell einer mineralisierten Knochenmatrix verwendet wurde, war das rekombinante Protein sowie die Glykosylierung desselben somit von Interesse. Im Fall der MHH-ES-1-Zellen wurde aufgrund einer schwachen Expressionsrate und geringen Ausbeute ein rekombinantes Fusionsprotein hergestellt, welches N-terminal eine His6-myc-fX-Sequenz enthält. Das His6-Motiv ermöglicht über Affinitätschromatographie eine leichtere Aufreinigung sowie höhere Ausbeuten des Proteins. Über die Faktor X-Schnittstelle kann die zusätzliche N-terminale Sequenz entfernt werden.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus serumfreien Zellüberständen sowie von aus humanem Knochen extrahiertem BM-40 wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen

durchgeführt, um die native Konformation der Proteine für eventuelle funktionelle Untersuchungen zu erhalten. Bei der Isolierung von BM-40 aus humanem Knochen wurde das Knochenmehl erst mit Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer von eventuellen Blut- und Knochenmarkrückständen befreit und anschließend mehrfach mit TBS gewaschen bevor die mineralisierte Matrix mit EDTA-Puffer extrahiert wurde. Für BM-40 aus Maus-EHS-Tumor konnte unter nicht denaturierenden Bedingungen keine ausreichende Reinheit erzielt werden. Daher wurde ein abschließender Reinigungsschritt unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dieses Material sowie kommerziell erhältliches BM-40 aus humanen Blutplättchen wurde daher nur für Untersuchungen eingesetzt, für die eine native Konformation der Proteine nicht von Bedeutung ist, wie die Glykosylierungsanalyse sowie massenspektrometrische Analysen.

## **4.2 Posttranslationale Modifizierung von BM-40**

### **4.2.1 Glykosylierungsmuster der verschiedenen Proteine**

Das Glykosylierungsmuster der gereinigten BM-40-Proteine wurde im SDS-Polyacrylamid-Gel überprüft. Alle untersuchten Proteine zeigten eine positive Reaktion durch ein verändertes Laufverhalten im SDS-Polyacrylamid-Gel nach Behandlung mit N-Glykosidase F, d.h. BM-40 aus allen sechs untersuchten Quellen ist N-glykosyliert. Dagegen konnte wie erwartet nur für BM-40 aus humanem Knochen sowie His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen eine positive Reaktion auf Endoglykosidase H nachgewiesen werden, wobei bei dem rekombinanten Protein aus MHH-ES-1-Zellen nur ein partieller Verdau auftrat. Somit trägt BM-40 aus EBNA-293-Zellen, SaOS-2-Zellen, humanen Blutplättchen sowie Maus-EHS-Tumor eine überwiegend komplexe N-Glykosylierung, während BM-40 aus humanem Knochen einen mannose-reicheren N-Glykosylierungstyp besitzt, und MHH-ES-1-Zellen wahrscheinlich ein Gemisch unterschiedlicher BM-40-Glykoformen sekretieren. Diese Ergebnisse bestätigen die aus der Literatur sowie aus den durchgeführten beschriebenen Voruntersuchungen bekannten Daten.

### 4.2.2 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A

Um die Vermutung zu überprüfen, daß MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40 aus einem Gemisch unterschiedlicher Glykoformen besteht, und eine Methode zu suchen, mit der diese Glykoformen getrennt werden könnten, wurde mit diesem Material eine Affinitätschromatographie mit dem Lektin Concanavalin A (Con A), welches sehr stark an Kohlenhydrate mit terminalen Mannose- oder Glukose-Resten bindet, durchgeführt. Komplexe N-Glykane mit mehr als drei Antennen binden erfahrungsgemäß nicht an Con A und befinden sich somit im Durchfluß, biantennäre komplexe N-Glykane binden schwach an Con A und können mit 15 mM Methylglukosid eluiert werden (Fraktion 1), während N-Glykane vom Hybrid- oder Oligomannose-Typ stark an Con A binden und erst mit 500 mM Methylglukosid bzw. Methylmannosid (Fraktion 2) eluiert werden (Hughes and Mills, 1983; Hughes et al., 1983; Gleeson et al., 1985; Hughes and Mills, 1985). Sowohl im Durchfluß als auch in beiden gebundenen Fraktionen war His6-myc-fX-BM-40 enthalten. Die Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF Massenspektrometrie nach Behandlung mit Endoglykosidase H ergab, daß im Durchfluß und in Fraktion 1 BM-40 mit einer komplexen und in Fraktion 2 mit einer mannose-reichen Oligosaccharidkette vorhanden war. Insbesondere die massenspektrometrische Überprüfung der unbehandelten im Vergleich zu Endoglykosidase H-behandelten Proben zeigte zudem, daß mit Hilfe dieser Affinitätschromatographie die unterschiedlichen Glykoformen von BM-40 erfolgreich getrennt werden können.

Analog zu der Con A-Affinitätschromatographie von MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40 wurde dieselbe Methode auf BM-40 aus humanem Knochen angewendet. Ursprünglich wurde diese Affinitätschromatographie für Knochen-BM-40 im Rahmen der Aufreinigung dieses Proteins durchgeführt, um eine höhere Reinheit des Proteins zu erzielen. Erwartet wurde aufgrund der Literatur bzw. der bis dahin durchgeführten Experimente, daß BM-40 aus Knochen vollständig in der stark bindenden Fraktion (Fraktion 2) von der Säule eluieren würde. Erstaunlicherweise wurde jedoch mittels Immunoblot BM-40 sowohl im Durchfluß als auch in beiden gebundenen Fraktionen nachgewiesen. Im Durchfluß waren geringe Mengen an Endoglykosidase H-sensitivem BM-40 enthalten, was wahrscheinlich auf eine unvollständige Bindung möglicherweise durch Überladung der Säule zurückzuführen ist. In Fraktion 1 war dagegen Endoglykosidase H-resistentes und damit komplex glykosyliertes BM-40 vorhanden, während BM-40 in Fraktion 2 wie erwartet Endoglykosidase H-sensitiv war und damit eine mannose-reiche N-Glykosylierung trug. Dieses Experiment lieferte einen ersten Hinweis, daß entgegen

den Aussagen früherer Studien (Kelm and Mann, 1991) in humanem Knochen auch komplex glykosyliertes BM-40, aufgrund der Con A-Bindungseigenschaften höchstwahrscheinlich biantennär, vorkommt. Auf diesen Aspekt wird später im Rahmen der Diskussion der Aufklärung der N-Glykan-Strukturen von BM-40 genauer eingegangen.

#### **4.2.3 Analyse mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie**

BM-40 aus den verschiedenen Quellen wurde unbehandelt sowie nach Verdau mit N-Glykosidase F mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht. Die Differenz der Molekulargewichte von unbehandelten bzw. mit N-Glykosidase F behandelten Proben ergibt die mittlere Masse der N-Glykane. Diese liegt für alle Protein-Präparate zwischen 1.5 und 2.7 kDa, was auf die Besetzung mit einem einzelnen Asparagin-verknüpften Kohlenhydrat hindeutet. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien, wonach von den beiden potentiellen N-Glykosylierungsstellen nur eine verwendet wird (Xie and Long, 1995; Hohenester et al. 1997). Die kleinste mittlere Masse der N-Glykane weist die mannose-reiche Con A-Fraktion (Fraktion 2) von MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40 mit 1.5 kDa auf. Nur wenig höher ist die mittlere Masse der Knochen-BM-40-Glykane (gemessen wurde der Gesamt-Pool der BM-40-Glykoformen aus Knochen) mit 1.7 kDa. Die mittlere Masse der Zucker der wahrscheinlich komplex glykosylierten BM-40-Proteine liegt zwischen 1.9 kDa (EBNA-293-BM-40) und 2.7 kDa (BM-40 aus humanen Blutplättchen). Der Vergleich der Molekulargewichte von deglykosyliertem BM-40 mit dem theoretischen Molekulargewicht der BM-40-Aminosäurekette läßt Rückschlüsse auf das Vorhandensein weiterer posttranslationaler Modifikationen zu. Nur His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen und BM-40 aus Maus-EHS-Tumor weisen deglykosyliert eine Masse auf, die dem theoretischen Wert entspricht. Dieser liegt für das Fusionsprotein bei 37.8 kDa und für Maus-BM-40 bei 32.4 kDa. Daraus folgt, daß BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen sowie aus Maus-EHS-Tumor sehr wahrscheinlich keine andere posttranslationale Modifikation als die N-Glykosylierung besitzt. Im Gegensatz dazu besitzen die übrigen Proteine nach vollständiger Deglykosylierung zumindest teilweise ein Molekulargewicht, das deutlich über dem theoretischen Wert liegt. Ungefähr 60 % des EBNA-293-BM-40 entsprechen dem theoretischen Molekulargewicht, der Rest liegt bis zu 0.6 kDa darüber. Für SaOS-2-BM-40 ist das Verhältnis umgekehrt: etwa 60 % tragen eine um 0.9 kDa erhöhte Masse, der Rest entspricht dem theoretischen Wert der Aminosäurekette. BM-40 aus diesen beiden Zelllinien trägt somit zumindest zum Teil weitere posttranslationale

Modifizierungen. Das gesamte Material aus humanem Knochen und humanen Blutplättchen weist nach vollständiger Deglykosylierung ein höheres als das theoretische Molekulargewicht auf, 0.4 kDa für Knochen-BM-40, 0.7 kDa für Blutplättchen-BM-40, d.h. in diesen Fällen sind die Proteine wahrscheinlich zu 100 % zusätzlich posttranslational modifiziert.

In früheren Studien wurden bereits posttranslationale Modifikationen von BM-40 untersucht. In mehreren Fällen wurden Hinweise auf Phosphorylierung von BM-40 gefunden. Aus fetalen Kälberknochen isoliertes BM-40 enthält 0.5 % organisches Phosphat (Termine et al., 1981), für BM-40 aus adulten Rinderknochen wurden 0.6 % nachgewiesen (Romberg et al., 1985). Für BM-40, welches aus prenatalen und neonatalen humanen Knochen isoliert wurde, konnten Phosphoserine detektiert werden (Fisher et al., 1987). In Untersuchungen mit BM-40, welches von der Maus Parietal Endoderm Zelllinie PYS sekretiert wird, konnte der Einbau von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  nachgewiesen werden, wobei hauptsächlich Phosphoserine und in geringerem Maße Phosphothreonine detektiert wurden (Engel et al., 1987; Hughes et al., 1987). Dagegen konnte in Experimenten mit fetalen Calvaria-Zellen aus Ratten (Nagata et al., 1991) und Schweinen (Domenicucci et al., 1988) kein Einbau von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  in sekretiertes BM-40 detektiert werden. BM-40 besitzt ausserdem eine potentielle Sulfatierungsstelle an Tyrosin 162 (Maillard et al., 1992). Die Sulfatierung von BM-40 ist bisher jedoch nicht dokumentiert. In Zellkulturexperimenten konnte kein Einbau von  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  in BM-40 von fetalen Ratten Calvaria-Zellen (Nagata et al., 1991) und Maus-Osteoblasten (Ecarot-Charrier et al., 1989) beobachtet werden.

Die Differenz zwischen dem theoretischen Molekulargewicht und den ermittelten Molekulargewichten der untersuchten deglykosylierten Proteine könnte also zumindest zum Teil auf Phosphorylierung zurückzuführen sein. Wie erwähnt wurde diese Modifikation zumindest für aus Knochen isoliertes BM-40 bereits mehrfach beschrieben. Das Vorhandensein eines Phosphatrestes würde gegenüber dem theoretischen Molekulargewicht eine Erhöhung von 80 Da bewirken. Bei den beobachteten Differenzen zwischen 0.4 kDa (Knochen-BM-40) und 0.9 kDa (SaOS-2-BM-40) ist es unwahrscheinlich, daß diese allein auf Phosphorylierung zurückzuführen sind. In Zellkulturexperimenten mit MHH-ES-1-Zellen, SaOS-2-Zellen und EBNA-293-Zellen konnte kein Einbau von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  oder  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  in BM-40 nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Eine weitere kovalente posttranslationale Modifikation, die für BM-40 beschrieben wurde (Aeschlimann et al., 1993), wird durch Transglutaminasen katalysiert. Transglutaminasen katalysieren die kovalente Verknüpfung von verschiedenen primären Aminen mit der  $\gamma$ -Carboxyamidgruppe von peptidgebundenen Glutaminresten. Häufig werden dadurch

$\gamma$ -Glutamyl- $\epsilon$ -Lysin-Querverknüpfungen innerhalb oder zwischen Proteinen gebildet (Lorand and Conrad, 1984). Es kann aber auch zu einem Einbau natürlich vorkommender Di- und Polyamine wie Spermidin und Putrescin oder Histamin kommen. Zwei Mitglieder der Transglutaminase-Familie sind Faktor XIII und Transglutaminase<sub>c</sub> (Gewebe-Transglutaminase, Transglutaminase Typ II). Faktor XIII ist das letzte Zymogen der Blutgerinnungskaskade, welches nach Thrombin-vermittelter Aktivierung die Quervernetzung von Fibringerinnseln katalysiert. Faktor XIII wird hauptsächlich von Blutplättchen exprimiert. Die calciumabhängige Transglutaminase<sub>c</sub> wird von einer Vielzahl von Zelltypen (Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen etc.) und in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Auch Osteoblasten weisen Transglutaminase-Aktivität auf. Transglutaminase-katalysierte Quervernetzung von Proteinen (BM-40, Osteopontin, Fibronectin, Fibrillin, Kollagene II, III, V, XI) in der extrazellulären Matrix z.B. von Knorpel und Knochen dient vermutlich der Stabilisierung (Aeschlimann et al., 1996; Aeschlimann and Thomazy, 2000). BM-40 konnte als Substrat für Transglutaminase<sub>c</sub> (Aeschlimann et al., 1993 und 1995) und Faktor XIII (Aeschlimann et al., 1996) identifiziert werden. Dabei wurden entweder BM-40-Oligomere oder Komplexe mit anderen Komponenten beobachtet (Aeschlimann et al., 1995). Die Haupt-Amino-Akzeptor-Stellen in BM-40 sind die Glutamine 3 und 4 im N-terminalen Bereich (Hohenadl et al., 1995).

Die Differenz zwischen der Masse der deglykosylierten Proteine und dem theoretischen Molekulargewicht, die für EBNA-293-BM-40, SaOS-2-BM-40, Blutplättchen- und Knochen-BM-40 beobachtet wurde, könnte also auf den Transglutaminase-katalysierten Einbau nicht identifizierter Di- oder Polyamine beruhen. Knochen und Blutplättchen weisen Transglutaminase-Aktivität auf. Da Transglutaminase-Aktivität auch für Osteoblasten beobachtet wurde, könnte dieses auch für SaOS-2-Zellen gelten. Auch EBNA-293-Zellen exprimieren Transglutaminasen (Neil Smyth, persönliche Mitteilung).

Welche posttranslationalen Modifikationen in den genannten Proteinen zusätzlich zur N-Glykosylierung noch auftreten, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Da das Hauptinteresse dieser Arbeit bei der Glykosylierung von BM-40 lag, wurde diese Fragestellung nicht weiter verfolgt. Die Aufnahme von MALDI-PSD-Massenspektren von Protease-verdauten Proben der isolierten Proteine könnte Aufklärung über Position und Art dieser zusätzlichen posttranslationalen Modifikation bringen. BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen, welches abgesehen von der N-Glykosylierung wahrscheinlich keine weitere Modifizierung aufweist, könnte dabei nach Entfernung der N-terminalen His6-myc-fX-Sequenz als Negativkontrolle verwendet werden.

#### 4.2.4 Aufklärung der N-Glykan-Strukturen von BM-40

Für die N-Glykan-Analyse der isolierten BM-40-Proteine wurden die N-Glykane enzymatisch mit N-Glykosidase F von den Proteinen abgetrennt und mit 2-Aminobenzamid (2-AB) fluoreszenz-markiert. Das Vorhandensein von terminalen Sialinsäuren sowie die Bestimmung ihrer Anzahl erfolgte mittels HPLC-Anionenaustauschchromatographie (Q Hyper D10). Da Sialinsäuren eine negative Ladung tragen, werden Kohlenhydrate in Abhängigkeit der Anzahl an Sialinsäuren von der Säule eluiert. Nicht sialinylierte und damit neutrale Glykane befinden sich im Durchfluß. Durch Vergleich mit bekannten Standards (Fetuin, Transferrin) erfolgte die Zuordnung. BM-40 aus allen untersuchten Quellen enthielt unterschiedliche Anteile an neutralen Oligosacchariden. Der Anteil lag im allgemeinen zwischen 40 und 50 %. Ein höherer Anteil an neutralen N-Glykanen wurde nur für Knochen-BM-40 (71.7 %) und BM-40 aus EBNA-293-Zellen (81.6 %) gefunden. EBNA-293-BM-40 war auch das einzige der untersuchten Proteine, das maximal eine terminale Sialinsäure gebunden hatte. Alle übrigen Proteine wiesen zumindest noch Strukturen mit zwei terminalen Sialinsäuren auf. Für BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen und humanen Blutplättchen wurden auch Kohlenhydrate mit drei terminalen Sialinsäuren detektiert.

Die Aufklärung der N-Glykan-Strukturen wurde mit Hilfe einer Normalphasen-HPLC-Säule durchgeführt. Bei dieser Methode eluieren die markierten Glykane in Abhängigkeit ihrer Größe und Verzweigung. Die Trennung erfolgt nach steigender Hydrophilie. Die Identifizierung der Glykan-Strukturen wird durch eine Kombination von sequenzielltem Abbau mit spezifischen terminalen Glykosidasen und Vergleich mit bekannten Standards erreicht. Diese Methode erfordert die vorherige Abspaltung terminaler Sialinsäuren, da anionische Strukturen so stark an die Säule binden, daß sie unter den verwendeten Bedingungen nicht eluiert werden können.

Die Analyse der N-Glykan-Strukturen ergab, daß BM-40 aus allen untersuchten Quellen komplexe N-Glykane besitzt, wobei nur rekombinantes EBNA-293-BM-40 und aus Blutplättchen isoliertes BM-40 ausschließlich komplexe Strukturen tragen. Rekombinantes SaOS-2-BM-40 und aus Maus-EHS-Tumor gereinigtes BM-40 enthalten zusätzlich noch N-Glykan-Strukturen vom Hybrid-Typ. Knochen-BM-40 weist ein Gemisch aus N-Glykan-Strukturen vom komplexen und vom Oligomannose-Typ auf. Nur für rekombinantes BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen konnten alle drei N-Glykosylierungs-Typen detektiert werden. Die Glykosylierungs-Typen und Glykan-Strukturen von BM-40 aus den verschiedenen Quellen sind in Tab. 4-1 schematisch dargestellt.

**Tab. 4-1: N-Glykan-Strukturen von BM-40**

Aufgeführt sind die für BM-40 aus verschiedenen Quellen identifizierten N-Glykan-Strukturen mit den prozentualen Anteilen. Die Belegung der rot markierten Positionen ist variabel.

□ = N-Acetylglukosamin, ● = Mannose, ◆ = Galaktose, ▼ = Fucose

	Glykosylierungs-Typ	Struktur	%
EBNA-293-Zellen	Komplex, biantennär		7
	Komplex, triantennär		93
SaOS-2-Zellen	Komplex, biantennär		95
	Hybrid		5
MHH-ES-1-Zellen	Komplex, biantennär		48
	Komplex, triantennär		17
	Hybrid		11
	Oligomannose		24
Knochen	Komplex, biantennär		53
	Oligomannose		47
Blutplättchen	Komplex, biantennär		47
	Komplex, triantennär		53
EHS-Tumor	Komplex, biantennär		80
	Hybrid		20



Für BM-40 aus EBNA-293-Zellen findet man überwiegend triantennäre komplexe Strukturen (93 %), 71 % der N-Glykane sind core-fukosyliert und 76 % besitzen ein N-Acetylglukosamin (GlcNAc) in zentraler Position der Pentasaccharid-Struktur („bisecting“ GlcNAc). Auffällig ist, daß nur unvollständig galaktosylierte N-Glykane vorhanden sind. Es ist jeweils entweder keine (33 %) oder nur eine terminale Galaktose vorhanden. Dies ist in Übereinstimmung mit dem geringen Gehalt und der geringen Anzahl (maximal eine) an Sialinsäuren, da diese an terminale Galaktose-Reste gebunden werden. Glykosylierung ist grundsätzlich spezies-, gewebe-, zelltyp- und proteinspezifisch. Welche Zuckerstrukturen eine Zelle synthetisieren kann, hängt dabei vom Enzymrepertoire der Zelle ab, d.h. der Expressionsrate entsprechender Glykosyltransferasen. Eher unreife N-Glykan-Strukturen wie Oligomannose-Glykane entstehen durch ein frühes Verlassen des Biosyntheseweges der Glykoproteine. Reife N-Glykan-Strukturen, die den Biosynthesepfad bis zu einem späten Stadium durchlaufen, zeichnen sich dagegen durch sehr komplexe Strukturen aus. Beim EBNA-293-BM-40 ist es offensichtlich zu einem relativ frühen Abbruch der Zuckerkettenverlängerung gekommen. EBNA-293-Zellen sind jedoch grundsätzlich in der Lage, auch komplexere N-Glykane aufzubauen. Die in unserem Institut von Martina Wuttke durchgeführte N-Glykan-Analyse von BSP (Bone Sialoprotein), welches rekombinant in EBNA-293-Zellen hergestellt, ergab eine Belegung mit überwiegend tetraantennären komplexen N-Glykanen (Wuttke et al., 2001). Alle Strukturen waren core-fukosyliert, zusätzlich traten auch GlcNAc  $\beta$ -1,4-geteilte („bisecting“) Glykane auf. Die Glykane waren entweder gar nicht oder vollständig (78 %) galaktosyliert. Es waren außerdem bis zu vier Sialinsäuren pro N-Glykan vorhanden. Die entsprechenden Enzyme, um eine größere Komplexität der BM-40-N-Glykane zu erreichen, sind demnach in den Zellen vorhanden. Möglicherweise führt die starke Überexpression an BM-40 in den transfizierten Zellen zu einer geringen Galaktosylierung von BM-40, d.h. die Menge an vorhandener Galaktosyltransferase könnte zu gering gewesen sein, um bei der starken BM-40-Expression eine vollständige Galaktosylierung zu erreichen. Dagegen spricht, daß bei BSP der Großteil der N-Glykane vollständig galaktosyliert war, sogar bei tetraantennären Strukturen. Zwar war die BM-40-Expression der transfizierten EBNA-293-Zellen (ca. 250 pmol/ml Zellkulturüberstand) deutlich höher als die BSP-Expression der entsprechend transfizierten Zellen (ca. 50 pmol/ml Zellkulturüberstand), jedoch waren beim BSP etwa drei N-Glykosylierungsstellen besetzt, während beim BM-40 nur eine besetzt wird. Wahrscheinlicher ist, daß im Fall von BM-40 die Peptidkette während der Peptidsynthese und dem Aufbau der N-Glykan-Strukturen in dieser Zelllinie eine Konformation einnimmt, die die Zugänglichkeit der Glykosylierungsstelle für die Galaktosyltransferase erschwert.

Für BM-40 aus SaOS-2-Zellen findet man vier verschiedene N-Glykanstrukturen, wobei der überwiegende Teil aus komplexen (95 %) und nur ein geringer Anteil aus Hybrid-Strukturen (5 %) besteht. Alle auf BM-40 gefundenen N-Glykane aus dieser Zelllinie sind biantennär und von einem eher einfachen Aufbau, d.h. aus einem eher unreifen Stadium des Glykosylierungsbiosyntheseweges. 87 % der Glykane sind außerdem core-fukosyliert und 36 % tragen ein „bisecting“ GlcNAc. Auch in diesem Fall, wie beim EBNA-293-BM-40, wurde keine vollständige Galaktosylierung der Glykane beobachtet. Alle Glykane tragen nur eine terminale Galaktose.

BM-40 aus Maus-EHS-Tumor weist nur zwei verschiedene, jeweils biantennäre und core-fukosylierte N-Glykan-Strukturen auf. 80 % der Glykane haben die Struktur A2G2F. Die restlichen 20 % der Proteinmoleküle tragen ein N-Glykan vom Hybrid-Typ. Die eine Antenne trägt dabei höchstwahrscheinlich zwei Mannose-Reste, während die zweite Antenne aus einem GlcNAc und einer terminalen Galaktose besteht. Zusätzlich ist eine core-Fukose und wahrscheinlich auch ein „bisecting“ GlcNAc vorhanden.

Für BM-40 aus humanen Blutplättchen konnten vier verschiedene N-Glykan-Strukturen identifiziert werden. Alle gehören dem komplexen Typ an und besitzen eine core-Fukose. Zusätzlich tragen 30 % der Glykane ein „bisecting“ GlcNAc. Die ermittelten Glykane bestehen etwa jeweils zur Hälfte aus biantennären und triantennären Strukturen. Alle Glykane sind vollständig galaktosyliert.

Aus humanen Knochen isoliertes BM-40 weist einfache, eher unreife Zuckerstrukturen auf. Die auf diesem Protein detektierten N-Glykane bestehen jeweils etwa zur Hälfte aus biantennären komplexen N-Glykanen bzw. N-Glykanen vom Oligomannose-Typ. Der Anteil an core-fukosylierten Glykanen liegt bei 8 %. Die biantennären komplexen N-Glykane sind vollständig galaktosyliert.

Die größte Heterogenität der N-Glykosylierung wurde für His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen beobachtet. 24 % der BM-40-Moleküle aus dieser Zelllinie besitzen eine N-Glykosylierung vom Oligomannose-Typ, 11 % weisen N-Glykane vom Hybrid-Typ auf, und 65 % tragen komplexe N-Glykan-Strukturen. Es treten biantennäre (48 %) und triantennäre (17 %) komplexe N-Glykan-Strukturen auf, von denen 70 % eine core-Fukose tragen.

In den NP-HPLC-Profilen der N-Glykane von EHS-BM-40, Blutplättchen-BM-40, Knochen-BM-40 und MHH-ES-1/His6-myc-fX-BM-40 traten jeweils mehr oder weniger stark ausgeprägt zu Beginn der Glykan-Profile einige kleinere Peaks auf, die nicht näher identifiziert werden konnten. Diese Peaks verschoben sich durch Glykosidase-Abbau zu geringeren Glukoseeinheiten

und befanden sich bei vollständigem Abbau mit allen verwendeten Glykosidasen im Bereich zwischen 4 und 5 Glukoseeinheiten, also noch vor der allen gemeinsamen Penatsaccharid-Grundstruktur (Core-Struktur, 5.2 Glukoseeinheiten). Da mit den verwendeten Glykosidasen kein weiterer Abbau als bis zur Core-Struktur möglich ist, könnte es sich um Artefakte handeln. Eine andere Möglichkeit wäre, daß es sich um ungewöhnlich modifizierte N-Glykane handelt. Gerade in den letzten Jahren wurden eine Reihe ungewöhnlicher Kohlenhydratstrukturen auf Proteinen entdeckt, sowohl für O- als auch für N-verknüpfte Glykane. Gewöhnlich sind zum Beispiel auf N-Glykanen N-Acetylglukosaminreste vorhanden. Inzwischen hat man jedoch Proteine gefunden, die auch terminale N-Acetylgalaktosaminreste in N-Glykanen enthalten. N-Glykan-Strukturen können außerdem auch sulfatiert sein. Auf komplexen N-Glykanen wurden N-Acetylgalaktosaminreste gefunden, die über eine säure-labile Phosphodiesterbrücke mit dem restlichen Glykan verbunden sind (Hayes and Varki, 1993). Diese Daten zeigen, daß ungewöhnliche N-Glykan-Strukturen auftreten können, die von den allgemein angenommenen Regeln abweichen. Ob es sich bei den beschriebenen Peaks um solche unüblichen Strukturen handelt, konnte bisher nicht beantwortet werden. Auf Sulfatierung des N-Glykans sollten diese Signale nicht zurückzuführen sein, da durch eine solche Modifikation die Hydrophilie des Glykans zunehmen würde und das Signal zu höheren Werten verschoben wäre.

Die Ergebnisse der N-Glykan-Analyse bestätigen die Abhängigkeit der Glykosylierung eines Proteins vom untersuchten Zelltyp. Wie bereits beschrieben wurde die Glykosylierung von BM-40 aus bovinem und humanem Knochen und humanen Blutplättchen bereits von Kelm und Mann (1991) untersucht. Damals wurde aufgrund der erhaltenen Resultate für Blutplättchen-BM-40 eine vollständige Glykosylierung vom komplexen Typ angenommen, während für Knochen-BM-40 auf eine vollständige N-Glykosylierung vom Oligomannose-Typ geschlossen wurde. Die in dieser Arbeit durchgeführte Aufklärung der N-Glykan-Strukturen bestätigt, daß Blutplättchen nur eine BM-40-Glykoform, nämlich mit komplexer N-Glykosylierung, exprimieren. Für BM-40 aus Knochen wurde dagegen ein Gemisch aus BM-40-Glykoformen detektiert. Dies scheint im Widerspruch zu der früheren Studie zu stehen. Betrachtet man jedoch die damals durchgeführten Experimente, so werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse durchaus bestätigt. In der früheren Studie wurde bovines Knochen-BM-40 und humanes Blutplättchen-BM-40 mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H verdaut, das Glykosylierungsmuster wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Bovines Knochen-BM-40 zeigte eine deutliche Verschiebung im SDS-Gel nach Endoglykosidase H-Verdau, Blutplättchen-BM-40 dagegen nicht. Dasselbe Resultat wurde auch in dieser Arbeit für humanes Knochen- und

humanes Blutplättchen-BM-40 gefunden. Überraschend ist, daß für MHH-ES-1/BM-40 nach Endoglykosidase H-Behandlung im SDS-Gel deutlich das Vorliegen eines Glykoform-Gemisches zu sehen war, während für Knochen-BM-40 nach entsprechendem Verdau nur eine, leicht verschobene Bande zu sehen war (Abb. 1, Abb. 9 D), obwohl sowohl die Con A-Chromatographie als auch die Aufklärung der N-Glykan-Strukturen ein Gemisch aus komplexer und mannose-reicher Glykosylierung nachwies. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß MHH-ES-1/BM-40 wie beschrieben keine weitere posttranslationale Modifikation trägt, so daß nach Deglykosylierung aufgrund der Entstehung eines homogenen Proteinpools relativ scharfe Signale entstehen. Dagegen trägt Knochen-BM-40 noch zusätzliche posttranslationale Modifizierungen, d.h. auch nach Deglykosylierung liegt noch ein heterogenes Proteingemisch vor, was dazu führt, daß die Proteinbande im SDS-Gel eher breit und diffus ist. Aus diesem Grund war möglicherweise keine Auftrennung der Bande zu sehen.

Weiterhin wurde in der Studie von Kelm und Mann die Affinität für Lens Culinaris Agglutinin (Lentil Lektin) und Con A untersucht. Dafür wurden bovines und humanes Knochen-BM-40 sowie humanes Blutplättchen-BM-40 auf Nitrocellulose transferiert und eine Bindung mit Hilfe der biotinylierten Lektine nachgewiesen. Lentil Lektin zeigte eine Bindung an Blutplättchen-BM-40 jedoch nicht an Knochen-BM-40, während für Con A eine Bindung an Knochen-BM-40 jedoch nicht an Blutplättchen-BM-40 beobachtet werden konnte. Kelm und Mann argumentierten, daß Con A an N-Glykane vom Oligomannose-Typ bindet und Knochen-BM-40 somit nur diesen Typ enthält, und Lentil Lektin an komplexe N-Glykane bindet und Blutplättchen-BM-40 somit diesem Typ entspricht. Diese Interpretation ist jedoch zu weitgehend. Zum einen konnte mit dieser Art der Untersuchung das Vorliegen eines Glykoform-Gemisches nur beschränkt nachgewiesen werden, da das Vorhandensein von nicht Con A-bindendem Knochen-BM-40 oder nicht Lentil-Lektin-bindendem Blutplättchen-BM-40 innerhalb heterogener Gemische an Glykoformen bei dieser Methode nicht auffallen würde. Außerdem ist die Annahme, daß Lentil Lektin spezifisch an komplexe N-Glykane bindet, nicht ganz korrekt. Lentil Lektin bindet  $\alpha$ -Mannose,  $\alpha$ -Glukose sowie  $\alpha$ -GlcNAc und weist damit eine Affinität zu der allen N-Glykanen gemeinsamen core-Struktur auf. Für eine effektive Bindung essentiell ist jedoch das Vorhandensein einer core-Fukose (Kornfeld et al., 1981), die für Blutplättchen-BM-40 immer vorhanden ist, während nur 8 % der Knochen-Strukturen core-fukosyliert sind. Die Aufklärung der N-Glykan-Strukturen im Rahmen dieser Dissertation hat gezeigt, daß Blutplättchen-BM-40 einen geringen Anteil an Strukturen aufweist, der schwach Con A binden sollte (A2G2F, 27 %), und auch Knochen-BM-40 Strukturen trägt, die Lentil Lektin binden sollten (A2G2F, 8 %). Möglicherweise lagen diese Mengen aufgrund des geringen

Anteils am Gesamtprotein-Pool in der von Kelm und Mann durchgeführten Methode unterhalb der Nachweisgrenze oder waren aufgrund der gewählten Bedingungen nicht detektierbar.

Diskrepanzen zwischen Glykosylierungsuntersuchungen verschiedener Studien können auch noch andere Ursachen haben. Es wurde bereits erwähnt, daß Glykosylierung spezies-, gewebe-, zelltyp- und proteinspezifisch ist. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß Glykosylierung auch entwicklungsspezifisch sein kann. Die Glykosylierung vieler Proteine ändert sich während der Entwicklung. Beispielsweise ist das Protein P<sub>0</sub>, das im Zentralnervensystem exprimiert wird, bei jungen Säugetieren nicht glykosyliert, während es bei älteren Tieren in N-glykosylierter Form auftritt (Kobata, 2000). Die in dieser Arbeit gewonnenen Informationen über die Glykosylierung von BM-40 aus humanem Knochen und humanen Blutplättchen können somit nicht als allgemeingültig betrachtet werden. Es ist durchaus möglich, daß der Glykosylierungstyp und die prozentuale Zusammensetzung der Zuckerstrukturen entwicklungsspezifisch variiert. Das Glykosylierungsprofil eines Glykoproteins kann ebenfalls pathologisch verändert sein. Beispielsweise sind Rheumatoide Arthritis und Tuberkulose mit einem Mangel an terminalen Galaktose-Resten an den Oligosaccharid-Ketten im Fc-Teil von IgG-Molekülen assoziiert (Rook et al., 1989; Furukawa and Kobata, 1991). Das humane Knochenmehl wurde von der Firma Immundiagnostik (Bensheim) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um einen Pool aus zu Knochenmehl verarbeiteten Oberschenkelköpfen, die aus Hüftoperationen gewonnen wurden. Für die verwendete Knochenmehlcharge lagen keine Informationen über die Anzahl, das Alter und den sonstigen Gesundheitszustand der Spender vor. Gleiches gilt für das kommerziell erworbene BM-40 aus humanen Blutplättchen. Daß jedoch in voneinander unabhängigen Studien für BM-40 aus Blutplättchen komplexe N-Glykan-Strukturen und für BM-40 aus Knochen eine mannose-reichere N-Glykosylierung gefunden wurde, bietet die Grundlage, daß ausgehend von der unterschiedlichen Glykosylierung eine Verwendung von BM-40 als Marker für Knochenstoffwechselerkrankungen möglich ist. Eine Möglichkeit wäre, ein solches diagnostisches Testverfahren in einem ELISA-ähnlichen System auf der Grundlage der unterschiedlichen Lektinbindungseigenschaften aufzubauen. Blutplättchen-BM-40 weist nur einen geringen Anteil schwach Con A-bindender Strukturen (A2G2F, 27 %) auf, während für Knochen-BM-40 nur Con A-bindende Strukturen gefunden wurden, von denen etwa die Hälfte schwach und die andere Hälfte, bestehend aus Oligomannose-Typ-Glykanen, stark an Con A bindet. Man könnte also eine, durch eine Knochenstoffwechselerkrankung ausgelöste Erhöhung der Konzentration von Knochen-BM-40 im Blut über die Erhöhung des Anteils an mannose-reichem BM-40 feststellen. Dazu könnte man BM-40-Antikörper an eine feste Phase binden, BM-40-haltige Proben bzw.

Patientenblutproben zufügen und mittels Zugabe von markierter Con A und der Wahl geeigneter Waschbedingungen spezifisch BM-40 mit mannose-reicher Glykosylierung nachweisen. Eine andere Möglichkeit der Unterscheidung wäre der Nachweis einer core-Fukose. Blutplättchen-BM-40 ist zu 100 % core-fukosyliert, während nur 8 % der N-Glykan-Strukturen von Knochen-BM-40 eine core-Fukose tragen. Wie erwähnt, ist für eine effektive Bindung von Lentil Lektin das Vorhandensein einer core-Fukose essentiell, d.h. es kann auch eine Unterscheidung der beiden BM-40-Varianten mittels Lentil Lektin erfolgen. Um den Anteil an Knochen-BM-40 im Blut zu analysieren, müßte man also einerseits mit Hilfe eines Festphasen-Immunoassays den Gesamtgehalt an BM-40 und andererseits durch Verwendung eines auf Lentil-Lektin beruhenden Assays den Anteil an Blutplättchen-BM-40 bestimmen. Da aufgrund der eher geringen Expression von BM-40 in den übrigen Geweben von Erwachsenen der Hauptanteil von BM-40 im Blut aus Blutplättchen und Knochen stammen sollte, könnte man somit aus der Differenz auf den Gehalt an Knochen-BM-40 im Blut schließen. In dieser Arbeit sollten die Voraussetzungen geschaffen werden, um ein solches diagnostisches Testsystem aufzubauen. Dies ist zum einen durch die detaillierte Aufklärung der N-Glykan-Strukturen von Knochen- und Blutplättchen-BM-40 und zum anderen durch die rekombinante Expression verschiedener BM-40-Glykoformen erreicht worden. Durch die Herstellung von BM-40 in den drei verschiedenen Zelllinien wurde ein breites Spektrum an BM-40-Glykoformen hergestellt, sowohl vom Oligomannose-Typ als auch vom komplexen Typ. Es stehen sowohl biantennäre als auch triantennäre komplexe Glykovarianten mit und ohne core-Fukosylierung zur Verfügung. EBNA-293-Zellen sollten verwendet werden, um blutplättchen-ähnliches BM-40 herzustellen. Die beiden Proteine stimmen darin überein, daß in beiden Fällen nur komplexe Strukturen vorhanden sind, sowohl biantennär als auch triantennär, sowohl mit als auch ohne „bisecting“ GlcNAc. Die Zusammensetzungen sind jedoch unterschiedlich. Beim EBNA-293-BM-40 sind außerdem nur 70 % der Strukturen core-fukosyliert (Blutplättchen 100 %). Ein weiterer deutlicher Unterschied ist die unvollständige Galaktosylierung von EBNA-BM-40 gegenüber der vollständigen beim Blutplättchen-BM-40. Daraus resultiert auch ein geringerer Gehalt an Sialinsäuren beim EBNA-BM-40. MHH-ES-1-Zellen sollten verwendet werden, um knochen-ähnliches BM-40 rekombinant herzustellen. Tatsächlich weist BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen alle N-Glykan-Strukturen auf, die bei Knochen-BM-40 gefunden wurden, sowie einen geringen Anteil weiterer Strukturen (triantennäre komplexe und Hybrid-Strukturen). 72 % der N-Glykan-Strukturen von MHH-ES-1-BM-40 entsprechen jedoch der Glykosylierung von Knochen-BM-40, jedoch mit unterschiedlichen prozentualen Anteilen. Durch weitere Reinigungsschritte mittels Lektin-Affinitätschromatographie kann man aus den gereinigten rekombinanten Proteinen jedoch

homogen glykosylierte Fraktionen herstellen, die als Referenz in den beschriebenen Testsystemen verwendet werden können.

Humanes BM-40 besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, die der N-Glykosylierungskonsensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr entsprechen. Nach bisherigen Erkenntnissen wird nur eine, Asn 99, besetzt. Die massenspektrometrische Analyse deutete auch in allen Fällen auf die Besetzung mit einer einzelnen Kohlenhydratkette hin. Die Verwendung von Asn 99 wurde bisher jedoch nur für BM-40 aus HEK 293-Zellen gezeigt (Xie and Long, 1995; Hohenester et al., 1997). Es wäre also durchaus möglich, daß bei unterschiedlichen BM-40-Glykoformen eine unterschiedliche Besetzung der N-Glykosylierungsstellen vorliegt. Für BM-40 aus Maus-EHS-Tumor kann das definitiv ausgeschlossen werden, da die potentielle N-Glykosylierungsstelle bei Asn 71 für Maus-BM-40 fehlt. Auch sonst ist die Besetzung von Asn 71 aufgrund der Aminosäuresequenz sehr unwahrscheinlich. Die Glykosylierung einer Stelle hängt nämlich nicht nur von der genannten Konsensus-Sequenz ab, auch die auf diese Sequenz folgende Aminosäure hat einen starken Einfluß. Insbesondere, wenn an dieser Stelle Prolin, Glutamat oder Tryptophan vorhanden ist, hat dies einen starken negativen Einfluß auf die Besetzung der Stelle (Reuter und Gabius, 1999). Dies ist beim Asn 71 der Fall, da dort auf die Konsensus-Sequenz ein Prolin folgt. Eine genaue Aufklärung könnte auch hier, wie im Fall der zusätzlichen posttranslationalen Modifikationen, die Aufnahme von MALDI-PSD-Massenspektren bringen.

Die unterschiedliche Glykosylierung von BM-40 in verschiedenen Geweben könnte auf unterschiedliche biologische Funktionen zurückzuführen sein. Für Blutplättchen- und Knochen-BM-40 wurden deutliche Unterschiede in der Fähigkeit der Kollagen-Bindung festgestellt (Kelm and Mann, 1991). Knochen-BM-40 zeigte im Festphasen-Immunoassay Bindung an Kollagen I, III und V, Blutplättchen-BM-40 dagegen nicht. Xie und Long (1995) beschrieben eine Zunahme der Bindung an Kollagen V von Knochen- und Blutplättchen-BM-40 nach Deglykosylierung mit N-Glykosidase F, beide Proteine wiesen deglykosyliert vergleichbare Affinität zu Kollagen V auf. Für BM-40 aus HEK-293-Zellen konnte im Festphasen-Immunoassay nur eine Bindung an Kollagen IV nachgewiesen werden, nicht jedoch an Kollagen I und III (Nischt et al., 1991). Im Oberflächenplasmonresonanz-Assay dagegen beobachtet man Bindung an Kollagen I, III, IV und V. Sasaki et al. (1997) beobachteten im Oberflächenplasmonresonanz-Assay für eine nicht-glykosylierte Mutante (N99Q), die in EBNA-293-Zellen exprimiert wurde, keine signifikante Änderung der Bindung an Kollagen I und IV, jedoch eine um das achtfache geringere Affinität zu Kollagen V gegenüber dem glykosylierten Protein. Möglich wäre ein sterischer Effekt der

N-Glykosylierung auf die BM-40-Kollagen-Bindung. Blutplättchen-BM-40 besitzt die am stärksten verzweigte Zuckerkette, besonders durch den hohen Gehalt an Sialinsäuren, so daß in diesem Fall der sterische Effekt am größten sein sollte. BM-40 aus 293-Zellen weist ebenfalls eine stärkere Verzweigung der Zuckerkette auf, so daß sich auch hier ein sterischer Effekt auswirken könnte. Knochen-BM-40 besitzt dagegen die einfachste und räumlich kleinste Glykosylierung. Es sind für BM-40 bereits andere Faktoren bekannt, die eine sterische Behinderung der BM-40-Kollagen-Bindung bedeuten. So wird die Zugänglichkeit der Kollagenbindungsstelle durch die darüberliegende  $\alpha$ -Helix C eingeschränkt. Die proteolytische Spaltung derselben durch verschiedene Matrix-Metalloproteinasen führt zu einer 7 bis 20fachen Erhöhung der Kollagenbindungsaffinität (Sasaki et al., 1997). Mit den nun zur Verfügung stehenden BM-40-Isoformen könnte die Kollagenbindung im Hinblick auf unterschiedliche biologische Funktionen der Glykoformen genauer untersucht werden. Dabei könnte man sowohl die Kollagenbindung der unbehandelten, als auch mit N-Glykosidase F bzw. Matrix-Metalloproteinasen behandelten BM-40-Isoformen untersuchen, um einen eventuellen sterischen Effekt nachzuweisen.

### 4.3 CD-Spektroskopie

Zur Analyse der Sekundärstruktur wurden von den nativ gereinigten Proteinen (EBNA-293-BM-40, SaOS-2-BM-40, MHH-ES-1-BM-40, Knochen-BM-40) CD-Spektren mit und ohne Calcium aufgenommen. In früheren Untersuchungen mit EHS-BM-40 und rekombinantem BM-40 aus 293-Zellen wurde eine calciuminduzierte Konformationsänderung und damit verbundene Erhöhung des  $\alpha$ -helikalen Anteils um ca. 30 % beobachtet. Diese wird durch die extrazelluläre calciumbindende (EC) Domäne verursacht. Die Kristallstruktur des FS-EC-Domänenpaares von BM-40 aus 293-Zellen ist ebenfalls bekannt (Hohenester et al., 1997).

Alle Proteine zeigten eine reversible calciuminduzierte Konformationsänderung, welche durch Änderung des CD-Signals bei 220 nm deutlich wird. Das Signal bei dieser Wellenlänge ist hauptsächlich auf den Gehalt an  $\alpha$ -Helix-Strukturen zurückzuführen. Die theoretischen Sekundärstrukturen wurden mit den Programmen CONTIN und SELCON berechnet. Für alle Proteine wurde eine Erhöhung des  $\alpha$ -helikalen Anteils durch Calciumzugabe beobachtet, wobei der Effekt für EBNA-293-BM-40 am deutlichsten (CONTIN: von 21 auf 31%) ausgeprägt war. Für His6-myc-fX-BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen konnte nur eine geringe, aber reproduzierbare



calciuminduzierte Konformationsänderung beobachtet werden (CONTIN: Erhöhung des  $\alpha$ -Helix-Anteils von 20 auf 23 %). Für dieses Protein muß man berücksichtigen, daß die zusätzliche N-terminale Sequenz ebenfalls einen Beitrag zum CD-Signal leistet. Noch etwas schwächer war der reproduzierbare beobachtete Effekt beim Knochen-BM-40: eine Zugabe von Calcium ergab eine Erhöhung des  $\alpha$ -helikalen Anteils von 16 auf 18 % (CONTIN), bei diesem Protein war auch der Gesamtgehalt an  $\alpha$ -Helix-Strukturen am geringsten. Daß dies auf eine eventuelle Denaturierung des Proteins durch die Bedingungen der Knochenextraktion zurückzuführen sein könnte, konnte ausgeschlossen werden (siehe Abb. 16). Möglicherweise liegt das Protein bereits im Knochen teilweise denaturiert vor, eventuell hervorgerufen durch Bindung an Hydroxylapatit. Insgesamt könnten die CD-Daten auf Unterschiede in der Proteinstruktur hinweisen. Da die untersuchten Proteine wie beschrieben unterschiedlich glykosyliert sind, könnte eine unterschiedliche Struktur durch einen Einfluß der Glykosylierung auf die Faltung des Proteins zurückzuführen sein.

#### **4.4 Lokalisation von BM-40 in einem Zellkulturmodell einer mineralisierten Extrazellulärmatrix**

In einem Zellkulturmodell einer mineralisierten Knochenmatrix sollte die Verteilung von BM-40 in der Extrazellulärmatrix untersucht werden. Die normale Funktion des Knochens hängt von dem Zusammenspiel verschiedener Zelltypen ab. Da jedoch primär Osteoblasten für die Synthese der extrazellulären Matrix des Knochens, die durch Einlagerung von Hydroxylapatit verkalkt, verantwortlich sind, werden in vielen Fällen primäre Osteoblasten bzw. osteoblasten-ähnliche Osteosarkom-Zelllinien als Modell einer mineralisierten Knochenmatrix eingesetzt. Die gut charakterisierte humane Osteosarkom-Zelllinie SaOS-2 gilt aufgrund der Expression einer Reihe von Osteoblastenmarkern als osteoblasten-ähnlich (Murray et al., 1987; Fukayama et al., 1988; Villareal et al., 1989; Ikeda et al., 1990). Auch ist diese Zelllinie in der Lage unter geeigneten Bedingungen (Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat) eine mineralisierte Matrix zu bilden. Daher kann diese Zelllinie als *in vitro* Modell einer mineralisierten Knochenmatrix verwendet werden (McQuillan et al., 1995).

Wie bereits erwähnt, wurde in mehreren Studien eine Bindung von BM-40 an verschiedene Kollagene, unter anderem auch Kollagen I, belegt. In früheren Studien wurde ebenfalls eine Bindung von BM-40 an Hydroxylapatit beschrieben (Termine et al., 1981). Aus diesem Grund

wurde vermutet, daß BM-40 in Knochen eine Verbindung der Kollagen-Matrix und der Mineralphase vermittelt, daher auch der für Knochen-BM-40 gewählte Name Osteonectin (Termine et al., 1981). Aufgrund dieser Informationen über BM-40 würde man bei der Untersuchung der Lokalisation von BM-40 in einem Zellkulturmodell einer Knochenmatrix drei theoretische Möglichkeiten erwarten: Assoziation mit Hydroxylapatit, Colokalisation mit Kollagen oder BM-40 ist Teil eines kollagen-unabhängigen Netzwerkes.

SaOS-2-Zellen wurden mehrere Tage postkonfluent sowohl mit als auch ohne Zusatz von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat kultiviert. Ascorbat ermöglicht die Ausbildung von Kollagenfibrillen und aktiviert die alkalische Phosphatase (Leboy et al., 1989; Beck et al., 2000).  $\beta$ -Glycerophosphat dient als Substrat der alkalischen Phosphatase. In früheren Studien, auch in unserem Institut, konnte gezeigt werden, daß SaOS-2-Zellen bei Kultivierung mit diesen Supplementen eine mineralisierte Extrazellulärmatrix bilden (McQuillan et al., 1995; M. Wuttke, Dissertation).

Die Untersuchung der unterschiedlich kultivierten Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung zeigte wie erwartet erst nach Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat die Ausbildung eines Kollagen I-Netzwerkes. Anschließend wurden mit Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat kultivierte SaOS-2-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen hinsichtlich der BM-40-Lokalisation und einer eventuellen Colokalisation mit Kollagen I untersucht. BM-40 war deutlich in der Extrazellulärmatrix nicht-permeabilisierter Zellen detektierbar. Das Protein zeigte jedoch nur geringe Colokalisation mit Kollagen I, d.h. BM-40 scheint Teil eines anderen Netzwerks zu sein, möglicherweise aufgrund Transglutaminase-katalysierter Querverknüpfungen, wie sie für BM-40 in der Knochen- und Knorpel-Matrix beschrieben wurden (Aeschlimann et al., 1996; Aeschlimann and Thomazy, 2000).

Um eine genauere Bestimmung der Lokalisation von BM-40 in der Extrazellulärmatrix postkonfluent mit verschiedenen Bedingungen kultivierter SaOS-2-Zellen zu ermöglichen, wurde nach Kultivierung die Extrazellulärmatrix geerntet und sequenziell mit Guanidiniumhydrochlorid, EDTA und erneut Guanidiniumhydrochlorid extrahiert. BM-40 wurde dabei hauptsächlich in den ersten Guanidiniumhydrochlorid-Extrakten detektiert, d.h. das Protein wurde in die extrazelluläre Matrix eingebaut. Erst zu einem späten Zeitpunkt, nach drei Wochen postkonfluenter Kultivierung mit Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat, konnte BM-40 auch in EDTA-Extrakten nachgewiesen werden, d.h. es kam zu diesem Zeitpunkt zu einem Einbau in die mineralisierte Matrix.

Aufgrund der früheren Daten zur Bindung von BM-40 an Kollagen I und Hydroxylapatit (Termine et al., 1981) wurde vermutet, daß BM-40 die kollagene Matrix mit der Mineralphase verbindet. Die Tatsache, daß BM-40 defiziente Mäuse Osteopenie entwickeln und eine verschlechterte Knochenbildung aufweisen (Delany et al., 2000), könnte darauf hindeuten, daß BM-40 für die Organisation und Mineralisierung der Knochenmatrix von Bedeutung ist. Der Einbau von BM-40 in die extrazelluläre Matrix und zu einem späteren Zeitpunkt in Hydroxylapatitkristalle in dem verwendeten Zellkulturmodell der Bildung einer mineralisierten Matrix stützt diese These. Das Modell bietet somit die Möglichkeit die Rolle von BM-40 während der Bildung und Mineralisierung der extrazellulären Matrix genauer zu untersuchen.

Insgesamt ist die mangelnde Colokalisation von BM-40 in diesem Modell überraschend. Aufgrund der bekannten Affinität zu Kollagen I (Termine et al., 1981) und der Tatsache, daß Kollagen I-defiziente Mäuse einen verschlechterten Einbau von BM-40 in die extrazelluläre Matrix (Iruela-Arispe et al., 1996) zeigen, hätte man eine stärkere Colokalisation der beiden Proteine erwartet. Möglicherweise kommt dieses Ergebnis durch die nicht knochenspezifische Glykosylierung von BM-40 in SaOS-2-Zellen (siehe 4.2.4) zustande. Wie bereits erwähnt, gibt es Hinweise darauf, daß die Art der Glykosylierung von BM-40 die Kollagen-Bindungs-fähigkeit beeinflusst (Kelm and Mann, 1991). Dies sollte in zukünftigen Bindungsstudien untersucht werden.

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Molekularbiologie**

#### **5.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

Alle molekularbiologischen Standardmethoden, soweit nicht anders erwähnt, wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Für die Herstellung aller benötigten Lösungen wurde deionisiertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore) benutzt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen.

##### **5.1.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Alle verwendeten Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen und unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen für Puffer und Temperatur eingesetzt. Für Testverdaus wurden ca. 2 µg DNA mit 2-10 U (Units) Enzym für 1-2 Stunden verdaut. In präparativen Ansätzen wurden 10-20 µg DNA mit 10-20 U Enzym über Nacht geschnitten.

##### **5.1.1.2 Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Gelelektrophoresen wurden standardmäßig in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) durchgeführt. Je nach Größe der DNA und des gewünschten Trennbereichs wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 % bis 2 % (w/v) verwendet. Die Agarose wurde unter Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt. Die DNA-haltigen Proben wurden in 6 x DNA-Probenpuffer (0,25% Bromphenol-Blau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 40% Glycerol und 10 mM EDTA in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) aufgenommen. Als Größenmarker diente die DNA-kb-Leiter der Firma Gibco. Die Elektrophorese wurde ungekühlt bei 4-8 Volt/cm durchgeführt und das Gel zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert.

### **5.1.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten und Reinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen**

Die PCR-Produkte bzw. die DNA-Banden wurden aus den Agarose-Gelen herausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), des GeneClean® Kits (Bio 101) oder mit dem NucleoSpin® Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des jeweiligen Herstellers isoliert.

### **5.1.1.4 Ligation**

Vektor und DNA-Fragment wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt, wobei etwa 10 ng linearisierter Vektor-DNA eingesetzt wurde. In einem Reaktionsansatz von 10 µl erfolgte die Ligation von Vektor und Fragment durch Zugabe von 400 U T4-DNA-Ligase (NEB) in Ligationspuffer (NEB) bei 16°C über Nacht.

### **5.1.1.5 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)**

Die Transformation und Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Es wurden entweder *E. coli* Bakterien des Stammes DH5α oder kompetente *E. coli* TOP10F'-Zellen (Invitrogen) verwendet.

### **5.1.1.6 Plasmid-Präparationen**

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* Bakterienkulturen in kleinem Maßstab (bis 10 µg) erfolgte nach Birnboim (1983). Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des Midi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch Extinktionsmessung bei 260 nm, wobei eine OD-Einheit 50 mg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Für reine DNA beträgt das Verhältnis der  $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$ .

### 5.1.1.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte erfolgte mit einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) Service Labor unter Leitung von Herrn Dr. M. Macht. Für das 'cycle sequencing' wurden 0,3-0,5 µg Plasmid-DNA und 3,2 pmol Primer in 10 µl Wasser gemischt. Die Sequenzierungsreaktion und die Elektrophorese wurden vom ZMMK-Service Labor durchgeführt.

Die Daten wurden mit dem Programm EditView 1.0.1 (Perkin Elmer) bzw. dem Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8.1 (Genetics Computer Group, Inc.) ausgewertet. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide können der Tabelle 5.1 entnommen werden.

**Tabelle 5.1: Für die Sequenzierung verwendete Primer**

M13 Universal (sense)	5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCACT-3'
M13 Reverse (antisense)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
SeqU (sense)	5'-TAGTGAACCGTCAGATCT-3'
Rev2 (antisense)	5'-CTGGATCCGGCCTTGCC-3'

## 5.1.2 Klonierung der Plasmide zur rekombinanten Expression von humanem BM-40

### 5.1.2.1 Herstellung des Konstrukts pCEP-Pu/BM-40

Die vollständige humane BM-40 cDNA inklusive Signalpeptid wurde über Not I und Xho I aus dem Vektor huBM-40blue (Nischt et al., 1991) in den episomalen eukaryotischen Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997) eingesetzt.

### 5.1.2.2 Herstellung des Konstrukts SP-his6-myc-fX-BM-40-pCEP-Pu

Die kodierende Sequenz der BM-40-cDNA (ohne Signalpeptid) wurde mittels PCR amplifiziert. Als Matrize wurde das Konstrukt huBM-40blue verwendet. Folgendes Primerpaar wurde verwendet:

BM-40-f1 (sense): 5'-GCC CGC TAG CCC CTC AGC AAG AAG-3'

BM-40-r1 (antisense): 5'-CAA TGA CTG CGG CCG CTT AGA TCA CAA GAT CCT TG-3'

Der Primer BM-40-f1 enthält eine Nhe I-, der Primer BM-40-r1 eine Not I-Schnittstelle (jeweils unterstrichen).

Die PCR wurde mit 100 ng huBM-40blue, jeweils 100 pmol Primer, je 0.2 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 U Pfu-Polymerase (Stratagene) in Pfu-Reaktionspuffer im RoboCycler (Stratagene) durchgeführt.

Das Insert wurde über Nhe I und Not I in den Vektor SP-his6- myc- fX-pCEP-Pu eingesetzt. Bei diesem Plasmid wurde zwischen die HindIII- und NheI-Schnittstelle im Polylinker des pCEP-Pu-Vektors eine cDNA-Kassette eingesetzt, die für das BM-40-Signalpeptid (SP), gefolgt von einer Hexahistidin- und einer Myc-Sequenz und einer Faktor X-Schnittstelle kodiert.

## 5.2 Zellkultur

### 5.2.1 Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in Zellkulturschalen (10 oder 15 cm Durchmesser, Falcon) bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> adhärent kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die humane embryonale Nierenzelllinie EBNA-293 (Invitrogen) wurde mit DMEM-F12, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin und 0.25 mg/ml G418 (Geneticin), die humane Osteosarkomzelllinie SaOS-2 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) wurde mit McCoy's 5A, 15 % FCS und 2 mM L-Glutamin und die humane Osteosarkomzelllinie MHH-ES-1 (DSMZ) wurde mit RPMI 1640, 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Die Kulturmedien wurden von GIBCO bezogen.

Konfluente Zellen wurden mit PBS (0.14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) gewaschen, durch Behandlung mit Trypsin/EDTA (50 mg/ml Trypsin, 20 mg/ml EDTA in PBS) abgelöst und im Verhältnis von 1:5 neu ausgesät.

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in Einfriermedium (10 % FCS, 10 % DMSO, 80 % Kulturmedium) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 5.2.2 Transfektion und Selektion der verwendeten Zelllinien

Die verwendeten Plasmide wurden mit Hilfe des Fugene-Transfektionsreagenzes (Roche), einer Mischung aus nicht-liposomalen Lipiden in 80 % Ethanol, in die verschiedenen Zelllinien eingeführt. Die Transfektion erfolgte mit Zellen, die 50 bis 80 % konfluent waren, auf 10 cm Zellkulturschalen. In einem Eppendorfgefäß wurden 100 µl serumfreies Kulturmedium mit 6 µl Fugene für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Eppendorfgefäß wurden 2 µg DNA vorgelegt, zu der dann die verdünnte Fugenelösung tropfenweise gegeben wurde. Das Gemisch wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen, die in serumhaltigem Kulturmedium vorlagen, hinzugefügt. Nach zwei Tagen wurde mit der Selektion der Zellen begonnen.

Bei Transfektionen mit den auf dem episomalen Expressionsvektor pCEP-Pu basierenden Konstrukten wurden die Zellen etwa 2 bis 4 Wochen mit 1 µg/ml Puromycin in Kulturmedium selektioniert.

Stabile Transfektionen wurden mit Hilfe des Konstrukts pRc/BM-40 durchgeführt. Nach etwa dreiwöchiger Selektion der Zellen mit 0.25 mg/ml G418 in Kulturmedium wurden einzelne Zellklone mit Trypsin/EDTA abgelöst, isoliert und einzeln weiterkultiviert.

### 5.2.3 Ernte serumfreier Überstände

Da die im FCS enthaltenen Proteine (hauptsächlich BSA) die Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus Zellkulturüberständen erschweren, wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz serumfrei kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gesammelt, mit 0.5 mM PMSF versetzt und bei -20°C gelagert.

### 5.2.4 Zellkulturmodell einer mineralisierten Knochenmatrix

Die humane Osteosarkomzelllinie SaOS-2 wurde in Passage 5 nach Erreichen der Konfluenz auf 10 cm Zellkulturschalen für 1 bis 3 Wochen postkonfluent kultiviert. Um die Bildung einer mineralisierten Matrix zu ermöglichen, wurde das Kulturmedium in Anlehnung an McQuillan et al. (1995) mit 0.25 mM Ascorbat und 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat versetzt. Zur Kontrolle wurden



Zellen ohne Supplement bzw. nur unter Zugabe von Ascorbat kultiviert. Für Immunfluoreszenzuntersuchungen (5.3.2) wurden die Zellen in LabTec-Kammern (glass chamber slides, NUNC) kultiviert. Die Extraktion der Extrazellulärmatrix der kultivierten Zellen wird in Abschnitt 5.4.5 beschrieben.

## 5.3 Immunologische Methoden

### 5.3.1 Immunoblot

Zuerst wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran NC, Schleicher und Schuell) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 4°C in einer Blotkammer (Transphor Electrophoresis Unit, Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech) in Boratpuffer (50 mM Borsäure, 10 % MeOH, pH 8,5) 1 h mit 2 mA/cm<sup>2</sup> oder mit 0.5 mA/cm<sup>2</sup> über Nacht. Durch Färbung mit Ponceau S (Serva) werden die Proteine auf der Membran sichtbar gemacht und die Markerbanden mit einem Stift markiert. Nach Entfernung des Farbstoffes durch Inkubation in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) wird die Membran durch Schwenken in 5 % Milchpulver/TBS blockiert, um unspezifische Bindungen an die Membran zu vermeiden. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (in 5 % Milchpulver/TBS) 1 h inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen mit TBS/Tween 20 (0,01 %) wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Die Inkubation von 1 h mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper ( $\alpha$ -Kaninchen-IgG oder  $\alpha$ -Maus-IgG, 1:2000, Dako) erfolgte ebenfalls in Blockpuffer. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS/Tween 20 wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Chemolumineszenz unter Einsatz des ECL (enhanced chemoluminescence)-Kits (Amersham) sichtbar gemacht. Die Chemolumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet: Kaninchen- $\alpha$ -human-BM-40 (polyklonal, 1:2000 verdünnt, Immundiagnostik), Kaninchen- $\alpha$ -Maus-BM-40 (polyklonal, 1:2000 verdünnt, R. Timpl, MPI für Biochemie), AON-1 (monoklonaler  $\alpha$ -BM-40-Antikörper, 1:100 verdünnt, Developmental Studies Hybridoma Bank).

### 5.3.2 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die Zellen wurden in einer LabTec-Kammer ausplattiert und unter Zugabe von 0.25 mM Ascorbat und 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat zum Kulturmedium (Kontrolle ohne Supplement) eine Woche lang postkonfluent kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen dreimal mit PBS (0.14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) gewaschen und anschließend mit 2 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Zellen, die permeabilisiert werden sollten, wurden für 2 min mit 0.2 % Triton X-100 in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 1 % Ziegenerum in PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1% Ziegenerum/PBS erfolgte für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit dem Sekundärantikörper für 1 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) gewaschen und zur Anfärbung der Zellkerne 10 min mit Bisbenzimidlösung (Bisbenzimid (Höchst) 1 mg/ml in Methanol; 1:1000 in TBS verdünnt) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS wurden die Kammern entfernt und die Zellen mit DAKO Mount versiegelt und mit Deckgläsern abgedeckt.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet: Kaninchen- $\alpha$ -human-BM-40 (polyklonal, Immundiagnostik, 1:200 verdünnt), Maus- $\alpha$ -Kollagen I (monoklonal, Sigma, 1:200 verdünnt) und Kaninchen- $\alpha$ -Fibronektin (polyklonal, M. Paulsson, 1:500 verdünnt).

Als Sekundärantikörper (beide von Jackson ImmunoResearch) wurden verwendet: DTAF-konjugierter Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG (1:200 verdünnt) sowie Cy3-konjugierter Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (1:800 verdünnt).

## **5.4 Proteinchemische Methoden**

BM-40 aus humanen Blutplättchen wurde von Calbiochem bezogen.

### **5.4.1 Allgemeine proteinchemische Methoden**

#### **5.4.1.1 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA-Fällung)**

Zur Konzentrierung von Proteinen, z.B. aus serum-freien Mediumüberständen, wurde die TCA-Fällung angewendet. 1 ml der zu fällenden Probe wird mit 10 µl 10% Triton-Lösung und anschließend mit 250 µl 50% wäßriger TCA-Lösung versetzt und nach gründlicher Vermischung für 15 min auf Eis gelagert. Dann werden die Proteine in der Zentrifuge bei 20000 g, 4° C für 15 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 1 ml eiskalten Aceton gewaschen und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde danach in reduzierendem Probenpuffer (62 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerol, 2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und 5 min bei 95° C denaturiert. Für Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde der gleiche Probenpuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet.

#### **5.4.1.2 Proteinfällung mit Ethanol**

Bei der Fällung von Proteinen mit Ethanol wurde die Proteinlösung auf eine Salzkonzentration von mindestens 0.15 M NaCl gebracht, mit dem neunfachen Volumen eiskaltem Ethanol versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden anschließend für 1 h bei 5000 g, 4°C, abzentrifugiert, getrocknet und in Puffer resuspendiert.

#### **5.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) mit Hilfe von Polyacrylamidgelen verschiedener Konzentrationen unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen (Probenpuffer siehe 5.4.1.1). Dabei überschichtet ein Sammelgel

(Tris-Glycin-Puffer pH 6.8; 4 % Acrylamid) ein Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 8.8; i.a. 12 % Acrylamid). Die Elektrophorese (Elektrophoresepuffer: 20 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS) wurde (Gelkammern: Mighty Small™ II SE 250 Gel Electrophoresis Unit, Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech) für etwa eine Stunde bei 160°C unter Wasserkühlung durchgeführt. Die Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassie-Brilliant Blue oder Silbernitrat sichtbar gemacht. Als Molekulargewichtsstandard wurde der LMW(Low Molecular Weight)-Marker (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet.

#### **5.4.1.4 Coomassie-Färbung**

Das Gel wurde 30 min in einer Färbelösung (0.2 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 50 % Methanol, 5 % Essigsäure) gefärbt. Nach der Entfärbung in 40 % Methanol, 10 % Essigsäure bis zur gewünschten Intensität der Banden wurden die Gele in 7 %iger Essigsäure aufbewahrt. Die Nachweisgrenze von Coomassie Brilliant Blue R250 liegt bei ca. 0.1 µg Protein.

#### **5.4.1.5 Silberfärbung**

Nach einer Fixierung der Proteinbanden im Gel (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure), folgt eine jeweils 15minütige Behandlung mit einer Glutaraldehyd-Lösung (30 % Ethanol, 0.4 M Natriumacetat, 0.3 % Essigsäure, 2 % Glutaraldehyd (25 %ig), 0.1 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und einer Silbernitrat-Lösung (0.1 % AgNO<sub>3</sub>, 0.025 % Formaldehyd). Zwischen diesen beiden Schritten wird gründlich mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Entwicklung erfolgt durch Inkubation in einer Natriumcarbonat-Lösung (2.5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.04 % Formaldehyd). Die Färbung mit Silber erlaubt den Nachweis von 0.1 ng Protein. (Westermeier, 1990; Dunn, 1993)

#### **5.4.1.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine erfolgte auf photometrischem Weg durch Messung der UV-Spektren über einen Wellenlängenbereich von 240-350 nm. Die Berechnung erfolgte unter Benutzung des Extinktionswertes bei 280 nm korrigiert um den Wert bei 320 nm um eventuell vorhandene Trübungen zu erfassen. Die molaren theoretischen Extinktions-

koeffizienten wurden mit dem Programm ProtParam am Schweizerischen Institut für Bioinformatik berechnet (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Folgende Extinktionskoeffizienten (280 nm) wurden verwendet: murines und humanes BM-40 ( $28380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), humanes His6-myc-fX-BM-40 ( $26030 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

## 5.4.2 Chromatographische Methoden

Mit Ausnahme der Auftrennungen mittels FPLC wurden alle Chromatographien bei 4°C durchgeführt. Puffer als auch Proteinlösungen wurden durch Filtration von Partikeln befreit.

### 5.4.2.1 Ionenaustauschchromatographie

Abhängig von ihrer Nettoladung und dem pH-Wert können Proteine unterschiedlich stark an Ionentauscher binden. Der Vorteil einer großen Bindungskapazität auch bei kleinen Matrixmengen machen die Ionentauscher zur ersten Wahl um eine Proteinreinigung zu beginnen. Die Elution erfolgt mit einem aufsteigenden linearen Salzgradienten.

Die Aufreinigung der Proteine wurde standardmäßig mit einer DEAE-Sepharose-Fast-Flow-Säule (Pharmacia, 100 bis 200 ml Säulenvolumen) begonnen. Hierbei handelt es sich um einen schwachen Anionenaustauscher mit an die Trägermatrix (Agarose) gekoppelten Diethylaminoethylgruppen. Als Puffer wurde 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, verwendet. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl, BM-40 eluierte bei etwa 200 mM NaCl.

Der zweite Reinigungsschritt war im Allgemeinen eine ResourceQ-Säule (Pharmacia), die in Verbindung mit einem FPLC(Fast Performance Liquid Chromatographie)-System (Pharmacia) benutzt wurde. Bei der ResourceQ-Säule handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher, dessen Matrix aus Polystyren/Divinylbenzol-Kugeln mit quaternären Aminen als Ladungsträgern besteht. Es wurden die gleichen Bedingungen wie bei der DEAE-Sepharose-Fast-Flow-Säule verwendet, BM-40 eluiert bei 250 bis 300 mM NaCl.

#### **5.4.2.2 Affinitätschromatographie mittels Histidinmotiv**

Das rekombinante Fusionsprotein His6-myc-fX-BM-40 konnte über eine Affinitätschromatographie mit Hilfe einer Kobalt-Talon-Matrix (Clontech) gereinigt werden. Eine Säule wurde mit 5 ml Matrix nach Angaben des Herstellers gepackt.

Vor der Affinitätsreinigung über die genannten Materialien wurden die serum-freien Mediumüberstände gegen 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0, 300 mM NaCl dialysiert. Das vorbereitete Medium wurde dann mittels Peristaltikpumpe auf die entsprechend äquilibrierte Säule geladen und die Matrix mit dem Phosphatpuffer nachgewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Imidazolgradienten (0-250 mM in Phosphatpuffer). Das Prinzip beruht auf der Verdrängung des Histidin-Motivs durch das Imidazol.

#### **5.4.2.3 Affinitätschromatographie mit Hitrap Heparin**

Für einige Reinigungen wurde eine Hitrap Heparin 1 ml-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine vom Hersteller vorgepackte Säule, die eine Heparin Sepharose High Performance-Matrix enthält, basierend auf einer Agarose-Matrix an die Heparin, ein sulfatiertes Glucosaminoglykan, gekoppelt ist. BM-40 zeigt eine schwache Bindung an diese Säule. Die Chromatographie wurde an einem FPLC-System in 50 mM Tris, pH 7.0, und einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl durchgeführt. BM-40 eluierte bei 100-150 mM NaCl.

#### **5.4.2.4 Affinitätschromatographie mit Concanavalin A (Con A)**

Verwendet wurde eine vorgepackte Hitrap Con A-Säule (1 ml, Amersham Pharmacia Biotech). Diese Säule enthält eine Agarose-Matrix, an die das Lektin Con A gekoppelt wurde. Dieses Lektin bindet bevorzugt Mannose- und Glukose-Reste. Die Säule wurde mit 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$  äquilibriert und die Probe gegen diesen Puffer dialysiert. Die Beladung der Säule erfolgte mit einer möglichst geringen Flußrate (0.1 ml/min). Die Elution erfolgte mit 15 bzw. 500 mM Methyl- $\alpha$ -D-Glukopyranosid.

### 5.4.3 Extraktion von BM-40 aus humanem Knochenmehl

Humanes Knochenmehl wurde von der Firma Immundiagnostik zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um zu Knochenmehl verarbeitete Oberschenkelköpfe, die von Patienten mit Hüftoperationen stammten. Die Extraktion wurde bei 4°C und unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (0.1 M 6-Aminohexansäure, 5 mM Benzamidinhydrochlorid, 0.5 mM PMSF, 5 mM N-Ethylmaleimid) zu allen verwendeten Puffern durchgeführt.

300 g Knochenmehl wurden über zwei Tage in einem Liter 4 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, von Blut- und Knochenmarkresten befreit. Der Rückstand wurde anschließend zur Entfernung des denaturierend wirkenden Guanidiniumhydrochlorid zweimal für 24 h mit jeweils 1.5 l 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, gewaschen. Die Freisetzung der nicht-kollagenen Proteine aus der verbliebenen mineralisierten Matrix erfolgte durch dreimalige Extraktion mit jeweils 1.5 l 0.5 M EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4.

### 5.4.4 Extraktion von EHS-Tumor

Die Extraktion wurde von Uwe Odenthal (Institut für Biochemie II, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln) durchgeführt.

60 g Maus-EHS-Tumor wurden in gefrorenem Zustand in kleine Stücke geschnitten, in 1.2 l TBS-PI, pH 7.4 (PI = 2 mM N-Ethylmaleimid, 2 mM PMSF), aufgenommen und mit einem Mixer homogenisiert. Nach Zentrifugieren (20 min., 8000 g, 4°C) wird der Überstand (TBS-Extrakt 1) abgenommen und der Rückstand erneut wie zuvor durch Homogenisieren mit einem Mixer mit TBS-PI extrahiert (TBS-Extrakt 2). Anschließend wird der Rückstand zweimal für jeweils 60 min. mit 300 ml TBS-PI, 10 mM EDTA, pH 7.4, extrahiert. BM-40 war in den EDTA-Extrakten enthalten und wurde in einem ersten Reinigungsschritt von Uwe Odenthal über eine Gelfiltration (CL4B, in TBS-PI) gereinigt.

### 5.4.5 Extraktion der extrazellulären Matrix von SaOS-2-Zellen

Mit und ohne Supplement kultivierte Zellen (siehe Abschnitt 5.2.4) und deren Matrix wurden in Anlehnung an Kasugai et al. (1992) extrahiert.

Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen dreimal mit PBS (0.14 M NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml eiskalter 0.5 M Ammoniaklösung für 40 s lysiert. Matrix und Überstand wurden mit einem Gummischaber von der Platte abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugation (1 bis 2 min bei 15000 g) wurde der Ammoniaküberstand abgenommen. Die Matrix wurde zweimal für 24 h mit 1 ml 4 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, danach zweimal für 24 h mit jeweils 1 ml 0.5 M EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 und abschließend erneut zweimal mit 1 ml 4 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, extrahiert. Zwischen den einzelnen Extraktionsschritten wurde jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Alle Lösungen enthielten als Proteaseinhibitoren 0.1 M 6-Aminohexansäure, 5 mM Benzamidinhydrochlorid und 1 mM PMSF. Die Extrakte wurden gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, dialysiert, mit TCA gefällt und mittels Immunoblot analysiert.

#### **5.4.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie**

Die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer (Reflex III, Bruker) durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) Service-Labor unter Leitung von Herrn Dr. M. Macht bzw. Herrn Dr. S. Müller durchgeführt. Die Proteine wurden jeweils auf eine Konzentration von 5 bis 10 pmol/μl in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, (unbehandelte bzw. mit 0.2 U N-Glykosidase F behandelte Proben) bzw. in 30 mM Natriumacetat, pH 5.8, (mit 2 mU Endoglykosidase H behandelte Proben) eingestellt.

#### **5.4.7 Circular Dichroismus-Spektroskopie**

Circular Dichroismus (CD) ist eine Methode um die Sekundärstruktur eines Proteins in Lösung zu messen. Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung eines rechts und eines links drehenden polarisierten Lichtstrahles beschrieben werden. Beim Durchdringen einer optisch aktiven Substanz werden diese um verschiedene Winkel gedreht und unterschiedlich absorbiert. Das austretende Licht kann als elliptisch polarisiert beschrieben werden. Die molare Elliptizität  $[\Theta]_{\lambda}$  ist ein Maß für die unterschiedliche Schwächung des rechts und links zirkular polarisierten Lichtes beim Durchtritt durch die chirale Verbindung. Jeder Sekundärstrukturanteil bringt einen eigenen Anteil in das CD-Spektrum eines Proteins ein. Unter Verwendung verschiedener



Algorithmen können aus der molaren Elliptizität die Anteile an  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, Schleifen und ungeordneter Struktur (random coil) eines Proteins abgeschätzt werden. Diese Algorithmen wurden durch systematischen Vergleich einer Vielzahl von Proteinen, deren Struktur durch Röntgenkristallographie bekannt ist, und der dazugehörigen CD-Spektren entwickelt. Darüber hinaus können Konformationsänderungen, beispielsweise durch Calciumbindung, eines Proteins verfolgt werden.

Die Aufzeichnung aller CD-Spektren erfolgte auf einem JASCO 715 CD-Spektrometer (JASCO Corporation, Tokio, Japan) in thermostatierten Quarz-Küvetten bei 25° C. Die Schichtdicke der Küvetten betrug 1 mm. Die Proteine lagen in bekannter Konzentration (jeweils zwischen 0.1 und 0.2 mg/ml) in 5 mM Tris-HCl, pH 7,4 vor. Die Spektren wurden über einen Bereich von 190-250 nm mit einer Geschwindigkeit von 10 nm/min und einer Response-Zeit von 4 s aufgezeichnet. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden je fünf Spektren akkumuliert. Die dargestellten Spektren wurden mit der geräteeigenen Software geglättet. Zur Sättigung der Proteine mit Calcium wurden 2 mM  $\text{CaCl}_2$  zugegeben. Zur Messung der calciumfreien Form wurden 4 mM EDTA zugefügt. Nach Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  oder EDTA wurde der Küvetteninhalt durch mehrmaliges Invertieren durchmischt und 5 min bis zur Einstellung des Gleichgewichts gewartet, bevor die nächste Messung durchgeführt wurde.

Zur Berechnung der molaren Elliptizität wurde vom Proteinspektrum das Spektrum des reinen Puffers subtrahiert. Der durch die Zugabe von Calcium oder EDTA entstandene Verdünnungseffekt wurde durch Korrekturfaktoren ausgeglichen. Ausgehend von einem mittleren Molekulargewicht einer Aminosäure von  $M=110$  g/mol wurde die molare Elliptizität [ $\text{deg cm}^2 \text{ dmo}^{-1}$ ] wie folgt berechnet:

$$[\Theta] = \frac{\Theta * M}{c * d}$$

$\Theta$ : gemessene Elliptizität [mdeg]

M: mittleres Molekulargewicht einer Aminosäure ( $M=110$  g/mol)

c: Proteinkonzentration [mg/ml]

d: Schichtdicke der Küvette [mm]

Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile erfolgte unter Verwendung der Programme CONTIN und SELCON (Greenfield, 1996).

## 5.5 Glykoanalytik

### 5.5.1 Analyse des N-Glykosylierungstyps mit N-Glykosidase F und Endoglykosidase H

N-Glykosidase F katalysiert die hydrolytische Spaltung aller N-Glykan-Typen vom Asparagin des Glykoproteins. Endoglykosidase H schneidet dagegen spezifisch N-Glykane vom Oligomannose- oder Hybrid-Typ.

Für Testverdaus, die mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert wurden, wurden 2-3 µg Protein mit 0.2 U N-Glykosidase F (Roche) in TBS, pH 7.4, 0.1 % SDS, 0.5 % Nonidet P-40, bzw. mit 2 mU Endoglykosidase H (Roche) in 0.1 M Natriumacetat, pH 5.8, 0.02 % SDS, 0.1 M β-Mercaptoethanol, über Nacht bei 37°C verdaut. Vor Zugabe des Enzyms wurde die Probe für 15 min bei 95°C denaturiert.

Für Proben, die mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert wurden, wurden 3 µg mit 0.2 U N-Glykosidase F in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, bzw. mit 2 mU Endoglykosidase H in 30 mM Natriumacetat, pH 5.8, über Nacht bei 37°C verdaut.

Als Kontrollen wurde Protein ohne Enzym unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

### 5.5.2 Freisetzung und Fluoreszenzmarkierung von N-Glykanen

Für die Analyse der N-Glykan-Strukturen mittels HPLC wurden die N-Glykane von den Proteinen abgespalten und am reduzierenden Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminobenzamid markiert.

Dafür wurden 200 µg Protein mit Ethanol gefällt (siehe 5.4.1.2). Nach Trocknung wurde das Pellet in 5 µl Lösung A (1 % SDS, 0.5 % β-Mercaptoethanol, 0.1 M EDTA) aufgenommen und bei Raumtemperatur für 30 min. inkubiert. Nach Zugabe von 40 µl Lösung B (0.2 M Natriumphosphat, pH 8.5) wurde das Gemisch bei 100°C für 5 min. denaturiert. Anschließend wurden 5 µl Lösung C (7.5 % Nonidet P-40) und 1 U N-Glykosidase F zugegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Entsalzung und Entfernung der Proteine erfolgte eine Aufarbeitung des Ansatzes über eine 150 mg Carbonsäule (Carbograph SPE, Alltech) nach Packer et al. (1998). Zuerst erfolgte die Äquilibration der Säule mit 2 ml 100 % Acetonitril (ACN), 2 ml 80 % ACN in 0.1 % TFA und 2 ml H<sub>2</sub>O. Nach Auftragung des Reaktionsgemisches auf die Säule wurden

Salze und Detergenzien durch Waschen mit 2 ml H<sub>2</sub>O entfernt. Nach Elution mit 2 ml 25 % ACN in 0,05 % TFA wurden die Glykane in der Speed Vac getrocknet.

Die Oligosaccharide wurden nach der Methode von Bigge et al. (1995) mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminobenzamid (Fluka, 2-AB, wurde zweimal in Ethanol rekristallisiert und unter Argon bei –20°C gelagert) markiert. Dazu wurden die Glykane in 2 µl einer 1 molaren Lösung von 2-Aminobenzamid in Essigsäure und 3 µl einer 2 molaren Lösung von NaBH<sub>3</sub>CN in DMSO gelöst. Nach zweistündiger Inkubation bei 60°C wurde das Gemisch auf Chromatographiepapier (Schleicher und Schuell) in 1 µl Schritten aufgetragen und getrocknet. Überschüssige Markierungsreagenzien wurden durch Chromatographie in n-Butanol : Ethanol : H<sub>2</sub>O (Lösungsmittelverhältnis: 4:1:1) entfernt. Das Chromatographiepapier wurde getrocknet und der Auftragungspunkt mit den Kohlenhydraten, die unter den Bedingungen der Chromatographie nicht wandern, ausgeschnitten. Die fluoreszenzmarkierten Glykane wurden mit 500 µl H<sub>2</sub>O über Nacht bei 4°C in Mikrofiltrationsgefäßen eluiert und bei –20°C gelagert.

### 5.5.3 Behandlung mit terminalen Glykosidasen

Um Informationen über die Struktur der N-Glykane zu erhalten, wurden die 2-AB markierten Oligosaccharide sequenziell mit spezifischen terminalen Glykosidasen verdaut. Dazu wurden 20 µl der markierten N-Glykane (siehe 5.5.2) für 18 bis 20 h bei 37°C in 50 mM Natriumcitrat, pH 4.5, mit jeweils 1 µl der Glykosidasen inkubiert. Folgende Glykosidasen wurden verwendet: Sialidase (Neuraminidase, NEB), β-Galaktosidase (X-5013, Glyco), β-N-Acetylhexosaminidase (X-5003, Glyco) und α-Fukosidase (X-5006, Glyco).

### 5.5.4 HPLC-Analyse von fluoreszenzmarkierten N-Glykanen

Die Analysen wurden an einer Beckman Gold HPLC-Anlage mit einem Fluoreszenz-Detektor (Shimadzu RF-10A XL) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Beckman Gold Nouveau. Die Anregungswellenlänge lag bei 330 nm, die Emissionswellenlänge bei 420 nm.

Das Vorhandensein sialinylierter Strukturen sowie die Anzahl der Sialinsäuren pro Glykan wurden durch Verwendung einer Anionenaustauschersäule auf Polymerbasis (Beckman, Q Hyper D10, 10 µm, 4.6 x 100 mm) ermittelt. Neutrale Zucker (ohne Sialinsäuren) binden nicht

an die Säule. Glykane mit Sialinsäuren sind negativ geladen und binden abhängig von der Anzahl der Sialinsäuren an die Säule. 20 µl der 2-AB markierten N-Glykane (in H<sub>2</sub>O) wurden auf die Säule gegeben, die Flussrate betrug 1 ml/min. Als Puffer wurden H<sub>2</sub>O (Puffer A) und 0.5 M Ammoniumformiat, pH 9.0, (Puffer B) verwendet. Eluiert wurde mit 0 % B für 1 min, von 0-5 % B für 12 min, von 5-21 % B für 13 min, von 21-80 % B für 25 min und 80-100 % B für 4 min.

Für die Aufklärung der N-Glykan-Strukturen wurde eine Normalphasen-Säule (Astec NH<sub>2</sub>-Polymer, 5 µm, 4.6 x 250 mm) verwendet. Die Trennung der Strukturen erfolgt nach Hydrophilie. Jeweils 10 µl der 2-AB markierten N-Glykane (unbehandelt bzw. mit terminalen Glykosidasen verdaut) wurden in der Speed Vac getrocknet und in 20 µl 75 % Acetonitril (ACN) in H<sub>2</sub>O auf die Säule gegeben. Da sialinylierte Strukturen unter den verwendeten Bedingungen sehr fest an die Säule binden und nicht eluiert werden können, wurden nur asialo Glykane eingesetzt. Die N-Glykane wurden mit einem linearen Gradienten von 68 % ACN, 32 % 50 mM Ammoniumformiat, pH 4.4, bis 50 % ACN, 50 % Ammoniumformiat, pH 4.4, innerhalb von 50 min und mit einer Flussrate von 0.5 ml/min eluiert.

Die verwendeten 2-AB markierten Standard-Glykane wurden entweder kommerziell erworben (A2G0FB, A4G0, Hybrid, alle von Glyco) oder von Dr. Stefan Müller zur Verfügung gestellt (Fetuin, Transferrin, Ribonuklease B).

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Aeschlimann, D., Wetterwald, A., Fleisch, H., Paulsson, M. (1993). Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes. *J. Cell Biol.* **120**, 1461-1470.
- Aeschlimann, D., Kaupp, O., Paulsson, M. (1995). Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate. *J. Cell Biol.* **129**, 881-892.
- Aeschlimann, D., Mosher, D., Paulsson, M. (1996). Tissue transglutaminase and factor XIII in cartilage and bone remodeling. *Sem. Throm. Hem.* **22**, 437-443.
- Aeschlimann, D., Thomazy, V. (2000). Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: The role of transglutaminases. *Conn. Tiss. Res.* **41**, 1-27.
- Alliel, P.M., Périn, J.P., Jollès, P. and Bonnet, F.J. (1993). Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour. *Eur. J. Biochem.* **214**, 347-350.
- Bassuk, J.A., Birkebak, T., Rothmier, J.D., Clark, J.M., Bradshaw, A., Muchowski, P.J., Howe, C.C., Clark, J.I. and Sage, E.H. (1999). Disruption of the SPARC locus in mice alters the differentiation of lenticular epithelial cells and leads to cataract formation. *Exp. Eye Res.* **68**, 321-331.
- Bassuk, J.A., Iruela-Arispe, M.L., Lane, T.F., Benson, J.M., Berg, R.A., Sage, E.H. (1993). Molecular analysis of chicken embryo SPARC (osteonectin). *Eur. J. Biochem.* **218**, 117-127.
- Basu, A., Kligman, L.H., Samulewicz, S.J., Howe, C.C. (2001). Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol.* **2**, 15.
- Beck, G.R., Zerler, B., Moran, E. (2000). Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *PNAS* **97**, 8352-8357.
- Bellahcene, A. and Castronovo, V. (1995). Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* **146**, 95-100.
- Bigge, J.C., Patel T.P., Bruce, J.A., Goulding, P.N., Charles, S.M. and Parekh, R.B. (1995). Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal. Biochem.* **230**, 229-238.
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**, 243-55.

- Bluteau, G., Mathieu, P., Conrozier, T., Vignon, E., Herbage, D., Mallein-Gerin, F. (2000). Direkter Eintrag in SWISS-PROT. Accession P36233.
- Bolander, M.E., Young, M.F., Fisher, L.W., Yamada, Y., Termine J.D. (1988). Osteonectin cDNA sequence reveals potential binding regions for calcium and hydroxyapatite and shows homologies with both a basement membrane protein (SPARC) and a serine proteinase inhibitor (ovomucoid). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2919-23.
- Bradshaw, A.D., Francki, A., Motamed, K., Howe, C., Sage, E.H. (1999). Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1569-1579.
- Brekken, R.A., Sage, E.H. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biology* **19**, 569-580.
- Cebon, J., Nicola, N., Ward, M., Gardner, I., Dempsey, P., Layton, J., Dührsen, U., Burgess, A.W., Nice, E., Morstyn, G. (1990). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 4483-4491.
- Clezardin, P., Malaval, L., Ehrensperger, A.-S., Delmas, P.D., Dechavanne, M., McGregor, J.L. (1988). Complex formation of human thrombospondin with osteonectin. *Eur. J. Biochem.* **175**, 275-284.
- Damjanovski, S., Liu, F., Ringuette, M. (1992). Molecular analysis of *Xenopus laevis* SPARC (Secreted Protein, Acidic, Rich in Cysteine). A highly conserved acidic calcium-binding extracellular-matrix protein. *Biochem. J.* **281**, 513-517.
- Delany, A.M., Amling, M., Priemel, M., Howe, C., Baron, R. and Canalis, E. (2000). Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 915-923.
- Diel, I.J., Solomayer, E.F., Seibel, M.J., Pfeilschifter, J., Maisenbacher, H., Gollan, C., Pecherstorfer, M., Conradi, R., Kehr, G., Böhm, E., Armbruster, F.P., Bastert, G. (1999). Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastasis. *Clin. Cancer. Res.* **5**, 3914-3919.
- Domenicucci, C., Goldberg, H.A., Hofmann, T., Isenman, D., Wasi, S., Sodek, J. (1988). Characterization of porcine osteonectin extracted from foetal calvariae. *Biochem. J.* **253**, 139-151.
- Dunn M.J. (1993). Gel Electrophoresis: Proteins. BIOS, Oxford.
- Dziadek, M., Paulsson, M., Aumailley, M., Timpl, R. (1986). Purification and tissue distribution of a small protein (BM-40) extracted from basement membrane tumor. *Eur. J. Biochem.* **161**, 455-464.
- Ebnet, K., Vestweber, D. (1999). Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem. Cell. Biol.* **112**, 1-23.

- Ecarot-Charrier, B., Bouchard, F., Delloye, C. (1989). Bone sialoprotein II synthesized by cultured osteoblasts contains tyrosine sulfate. *J. Biol. Chem.* **264**, 20049-20053.
- Engel, J., Taylor, W., Paulsson, M., Sage, H. and Hogan, B. (1987). Calcium binding domains and calcium-induced conformational transition of SPARC/BM-40/osteonectin, an extra-cellular glycoprotein expressed in mineralized and nonmineralized tissues. *Biochemistry* **26**, 6958-6965.
- Fisher, L.W., Hawkins, G.R., Tuross, N., Termine, J.D. (1987). Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, Bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.* **262**, 9702-9708.
- Fukayama, S., Bosma, T.J., Goad, G.L., Voelkel, E.F., Tashjian, A.H. (1988). Human parathyroid hormone-related protein and human PTH: Comparative biological activities on human bone cells and bone resorption. *Endocrinology* **123**, 2841-2848.
- Funk, S.E. and Sage, E.H. (1991). SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2648-2652.
- Funk, S.E. and Sage, E.H. (1993) Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J. Cell Physiol.* **154**, 53-63.
- Furukawa, K., and Kobata, A. (1991). IgG galactosylation – its biological significance and pathology. *Mol. Immunol.* **28**, 1333-1340.
- Gilmour, D.T., Lyon, G.J., Carlton, M.B., Sanes, J.R., Cunningham, J.M., Anderson, J.R., Hogan, B.L., Evans, M.J. and Colledge, W.H. (1998). Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J.* **17**, 1860-1870.
- Gleeson, P.A., Feeney, J., Hughes, R.C. (1985). Structures of N-glycans of a ricin-resistant mutant of baby hamster kidney cells. Synthesis of high-mannose and hybrid N-glycans. *Biochemistry* **24**, 493-503.
- Göhring, W., Sasaki, T., Heldin, C.H., Timpl, R. (1998). Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope. *Eur. J. Biochem.* **255**, 60-66.
- Gooley, A.A., Williams, K.L. (1994). Towards characterizing O-glycans: the relative merits of *in vivo* and *in vitro* approaches in seeking peptide motifs specifying O-glycosylation sites. *Glycobiology* **4**, 413-417.
- Greenfield, N.J. (1996). Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Anal. Biochem.* **235**, 1-10.
- Guermah, M., Crisanti, P., Laugier, D., Dezelee, P., Bidou, L., Pessac, B. and Calothy, G. (1991). Transcription of a quail gene expressed in the embryonic retinal cells is shut off sharply at hatching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4503-4507.

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hasselaar, P., Loskutoff, D.J., Sawdey, M. and Sage, E.H. (1991). SPARC induces the expression of type I plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 13178-13184.
- Hasselaar, P. and Sage, E.H., (1992). SPARC antagonizes the effect of bFGF on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J. Cell Biochem.* **49**, 272-283
- Hayes, B.K. and Varki, A. (1993). The biosynthesis of oligosaccharides in intact golgi preparations from rat liver. *J. Biol. Chem.* **268**, 16170-16178.
- Hohenadl, C., Mann, K., Mayer, U., Timpl, R., Paulsson, M., Aeschlimann, D. (1995). Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminase<sub>c</sub>-catalyzed modification. *J. Biol. Chem.* **270**, 23415-23420.
- Hohenester, E., Maurer, P., Hohenadl, C., Timpl, R., Jansonius, J.N. and Engel, J. (1996). Structure of a novel extracellular Ca<sup>2+</sup>-binding module in BM-40. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 67-73.
- Hohenester, E., Maurer, P. and Timpl, R. (1997). Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO J.* **16**, 3778-3786.
- Horton, W.A. (1993). ). Morphology of connective tissue: cartilage. *Connective tissue and its heritable disorders*, 73-84.
- Hughes, R.C., Mills, G. (1983). Analysis by lectin affinity chromatography of N-linked glycans of BHK cells and ricin-resistant mutants. *Biochem. J.* **211**, 575-587.
- Hughes, R.C., Mills, G. (1985). Hybrid sialylated N-glycans are minor constituents of normal BHK-cell glycoproteins and a prominent feature in glycoproteins of some ricin-resistant cell lines. *Biochem. J.* **226**, 487-498.
- Hughes, R.C., Mills, G., Stojanovic, D. (1983). Hybrid, sialylated N-glycans accumulate in a ricin-resistant mutant of baby hamster kidney BHK cells. *Carbohydr. Res.* **120**, 215-234.
- Hughes, R.C., Taylor, A., Sage, H., Hogan, B.L.M. (1987). Distinct patterns of glycosylation of colligin, a collagen-binding glycoprotein, and SPARC (osteonectin), a secreted Ca<sup>2+</sup>- binding glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* **163**, 57-65.
- Ikeda, K., Imai, Y., Fukase, M., Fugita, T. (1990). The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human osteoblast-like osteosarcoma cells: Modification of response to PTH. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **168**, 889-897.
- Iruela-Arispe, M.L., Vernon R.O., Wu, H., Jaenisch, R. and Sage, H. (1996). Type I collagen-deficient Mov-13 mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: implications for Fibroblast Function. *Dev. Dyn.* **207**, 171-183.



- Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D., Kleinman, H.K. (1999). Osteonectin promotes cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res.* **59**, 4453-4457.
- Johnston, I.G., Paladino, T., Gurd, J.W. and Brown, I.R. (1990). Molecular Cloning of SC1: A putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to Osteonectin/BM-40/SPARC. *Neuron* **2**, 165-176.
- Kasugai, S., Nagata, S., Sodek, J. (1992). Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), Osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. *J. Cell. Physiol.* **152**, 467-477.
- Kelm, R.J., Hair, G.A., Mann, K.G., Grant, B.W. (1992). Characterization of human osteoblast and megakaryocyte-derived osteonectin (SPARC). *Blood* **80**, 3112-3119.
- Kelm, R.J., and Mann, K.G. (1991). The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation. *J. Biol. Chem.* **266**, 9632-9639.
- Kobata, A. (2000). A journey to the world of glycobiology. *Glycoconjugate J.* **17**, 443-464.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C. and Timpl, R. (1997). Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett.* **414**, 557-561.
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Kornfeld, K., Reitman, M.L., Kornfeld, R. (1981). The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. *J. Biol. Chem.* **256**, 6633-6640.
- Kupprion, C., Motamed, K. and Sage, H. (1998). SPARC (BM-40, Osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 29635-29640.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lane, T.F. and Sage, E.H. (1990). Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites modulate cell shape. *J. Cell Biol.* **111**, 3065-3076.
- Lane, T.F. and Sage, E.H. (1994). The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* **8**, 163-173.
- Lankat-Buttgereit, B., Mann, K., Deutzmann, R., Timpl, R., Krieg, T. (1988). Cloning and complete amino acid sequences of human and murine basement membrane protein BM-40 (SPARC, osteonectin). *FEBS Lett.* **236**, 352-356.
- Leboy, P.S., Vaia, L., Uschmann, B., Golub, E., Adams, S.L., Pacifici, M. (1989). Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **264**, 17281-17286.

- Ledda, F., Bravo, A.I., Adris, S., Bover, L., Mordon, J. and Podhajcer, O.L. (1997). Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nature Med.* **3**, 171-176.
- Lerner, U.H. (2000). Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biology* **19**, 107-120.
- Lorand, L. and Conrad, S.M. (1984). Transglutaminases. *Mol. Cell. Biochem.* **58**, 9-35.
- Maillard, C., Malaval, L., Delmas, P.D. (1992). Immunological screening of SPARC/osteonectin in nonmineralized tissues. *Bone* **13**, 257-264.
- Mann, K., Deutzmann, R., Paulsson, M., Timpl, R. (1987). Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS Letters* **218**, 167-172.
- Marshall, R.D. (1972). Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 673-702.
- Mason, I.J., Taylor, A., Williams, J.G., Sage, H. und Hogan, B.L.M. (1986). Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell "culture shock" glycoprotein of  $M_r=43,000$ . *EMBO J.* **5**, 1465-1472.
- Maurer, P., Mayer, U., Bruch, M., Jenö, P., Mann, K., Landwehr, R., Engel, J. and Timpl, R. (1992). High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin). *Eur. J. Biochem.* **205**, 233-240.
- Maurer, P., Hohenadl, C., Hohenester, E., Göhring, W., Timpl, R. and Engel, J. (1995). The C-terminal portion of BM-40 (SPARC, Osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds Calcium and collagen IV. *J. Mol. Biol.* **253**, 347-357.
- Maurer, P., Göhring, W., Sasaki, T., Mann, K., Timpl, R. and Nischt, R. (1997). Recombinant and tissue-derived mouse BM-40 bind to several collagen types and have increased affinities after proteolytic activation. *Cell Mol. Life Sci.* **53**, 478-484.
- Mayer, U., Aumailley, M., Mann, K., Timpl, R., Engel, J. (1991). Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin, SPARC) to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* **198**, 141-150.
- McQuillan, D.J., Richardson, M.D., Bateman, J.F., (1995). Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SaOS-2). *Bone* **16**, 415-426.
- Mok, S.C., Chan, W.Y., Wong, K.K., Muto, M.G., Berkowitz, R.S. (1996). SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene* **12**, 1895-1901.
- Muramatsu, T. (1993). Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas. *Glycobiology* **3**, 294-296.

- Murphy-Ullrich, J.E., Lane, T.F., Pallero, M.A. and Sage, E.H. (1995). SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the calcium-binding EF-hand. *J. Cell Biol.* **57**, 341-350.
- Murray, E., Provvedini, D., Curran, D., Catherwood, B., Sussman, H., Manolagas, S. (1987). Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SaOS-2) with high alkaline phosphatase activity. *J. Bone Min. Res.* **2**, 231-238.
- Nagata, T., Bellows, C.G., Kasugai, S., Butler, W.T., Sodek, J. (1991). Biosynthesis of bone proteins [SPP-1 (secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP (bone sialoprotein) and SPARC (osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. *Biochem. J.* **274**, 513-520.
- Nehrke, K., Hagen, F.K., Tabak, L.A. (1996). Charge distribution of flanking amino acids influence O-glycan acquisition *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **271**, 7061-7065.
- Nischt, R., Pottgiesser, J., Krieg, T., Mayer, U., Aumailley, M. and Timpl, R. (1991). Recombinant expression and properties of the human calcium-binding extracellular matrix protein BM-40. *Eur. J. Biochem.* **200**, 529-536.
- Norose, K., Clark, J.I., Syed, N.A., Basu, A., Heber-Katz, E., Sage, E.H. and Howe, C.C. (1998). SPARC deficiency leads to early-onset cataractogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 2674-2680.
- Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R. and Redmond, J.W. (1998). A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *Glycoconj. J.* **15**, 737-747.
- Porter, P.L., Sage, E.H., Lane, T.F., Funk, S.E., Gown, A.M. (1995). Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 791-800.
- Pottgiesser, J., Maurer, P., Mayer, U., Nischt, R., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., Engel, J. (1994). Changes in calcium and collagen IV binding caused by mutations in the EF hand and other domains of extracellular matrix protein BM-40 (SPARC, Osteonectin). *J. Mol. Biol.* **238**, 563-574.
- Raines, W.E., Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L., Ross, R. and Sage, H. (1992). The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1281-1285.
- Reed, M.J. and Sage, E.H. (1996) SPARC and the extracellular matrix: Implications for cancer and wound repair. In Güthert, U., and Birchmeier, W., (eds.). Attempts to Understand Metastasis Formation I. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **231**, 81-94.
- Reuter, G. and Gabius, H.-J. (1999). Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool? *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 368-422.
- Romberg, R.W., Werness, P.G., Lollar, P., Riggs, B.L., Mann, K.G. (1985). Isolation and characterization of native adult osteonectin. *J. Biol. Chem.* **260**, 2728-2736.

- Rook, G.A., Attiyah, R.A., Foley, N. (1989). The role of cytokines in the immunopathology of tuberculosis, and the regulation of agalactosyl IgG. *Lymphokine Res.* **8**, 323-328.
- Rosenblatt, S., Bassuk, J.A., Alpers, C.E., Sage, E.H., Timpl, R., Preissner, K.T. (1997). Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins: characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM-40, SPARC). *Biochem. J.* **324**, 311-319.
- Sage, E.H., Johnson, C. and Bornstein, P. (1984). Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.* **259**, 3993-4007.
- Sage, E.H., Vernon, R., Funk, S., Everitt, E. und Angello, J. (1989). SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent binding to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **109**, 341-356.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaki, T., Göhring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knäuper, V., Murphy, G. and Timpl, R. (1997). Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J. Biol. Chem.* **272**, 9237-9243.
- Sasaki, T., Hohenester, E., Göhring, W. and Timpl, R. (1998). Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J.* **17**, 1625-1634.
- Schachter, H., Brockhausen, I. (1992). The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetyl-galactosamine-linked carbohydrate moieties. In Allen, H.J., and Kisailus, E.C., (eds.), *Glycoconjugates. Composition, structure and function*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 263-332.
- Schenk, R.K., Felix, R., Hofstetter, W. (1993). Morphology of connective tissue: bone. *Connective tissue and its heritable disorders*, 85-101.
- Schwarzbauer, J.E., and Spencer, C.S. (1993). The *Caenorhabditis elegans* homologue of the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and mobility. *Mol. Biol. Cell* **4**, 941-952.
- Seibel, M.J. (2000). Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos. Int.* **Suppl. 6**, S18-29.
- Shibanuma, M., Mashimo, J., Mita, A., Kuroki, T. and Nose, K. (1993). Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor- $\beta$ 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur. J. Biochem.* **217**, 13-19.
- Snider, M.D. (1984). Biosynthesis of glycoproteins: formation of N-linked oligosaccharides. In Ginsburg, V., and Robbins, P.W., (eds.), *Biology of carbohydrates. 2*. John Wiley and Sons, New York, N.Y., 163-198.

- Stenner, D.D., Tracy, R.P., Riggs, B.L., Mann, K.G. (1986). Human platelets contain and secrete osteonectin, a major protein of mineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6892-6896.
- Tang, S., and McKeown, B.A. (1995). Direkter Eintrag in NCBI-Datenbank. Accession AAC99813.
- Termine, J.D., Belcourt, A.B., Conn, K.M., Kleinman, H.K. (1981). Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. *J.Biol.Chem.* **256**, 10403-10408.
- Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L., Martin, G.R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**, 99-105.
- Tremble, P.M., Lane, T.F., Sage, E.H. and Werb, Z. (1993). SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellularmatrix-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **121**, 1433-1444.
- Vannahme, C., Schübel, S., Herud, M., Gösling, S., Hülsmann, H., Paulsson, M., Hartmann, U. and Maurer, P. (1999). Molecular cloning of testican-2; defining a novel calcium-binding proteoglycan family expressed in brain. *J. Neurochem.* **73**, 12-20.
- Varki, A. (1992). Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 257-266.
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**: 97-130.
- Villareal, X.S., Mann, K.G., Long, G.L. (1989). Structure of a human osteonectin based upon analysis of cDNA and genomic sequences. *Biochemistry* **28**, 6483-6491.
- Westermeier R. (1990). ElektrophoresePraktikum. VCH, Weinheim.
- Woitge, H.W., Seibel, M.J., Ziegler, R. (1993). Knochenstoffwechsel: Biochemie und klinisch-chemische Diagnostik. *DG Klinische Chemie Mitteilungen* **24**, 309-331.
- Wuttke, M., Müller, S., Nitsche, D.P., Paulsson, M., Hanisch, F.G., Maurer, P.(2001). Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J. Biol. Chem.* **276**, 36839-36848.
- Xie, R.-L. and Long, G.L. (1995). Role of N-linked glycosylation in human osteonectin. *J.Biol.Chem.* **270**, 23212-23217.
- Yates, J.L., Warren, N. und Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**, 812-815.

## 7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar
CD	Circular Dichroismus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EBNA	Epstein-Barr Nuclear Antigen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EHS-Tumor	Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish-Peroxidase
kDa	Kilodalton
M	Molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
min	Minute
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium- n-Dodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TOF	Time of flight
Tris-HCl	Tri-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
U	Units

## **Erklärung zur Dissertation**

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß die Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat und noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie daß ich eine solche Veröffentlichung vor Ablauf des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Mats Paulsson betreut worden.

Keine Teilpublikationen.

Köln, November 2001

Brigitte Kaufmann



## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die sehr interessante Themenstellung und die engagierte Unterstützung sowie Herrn Dr. Patrik Maurer für die ausgezeichnete Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jonathan C. Howard für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. H.-G. Schmalz für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei der Firma Immundiagnostik möchte ich mich für die Bereitstellung von Antikörpern und humanem Knochenmehl bedanken.

Für die Durchführung der massenspektrometrischen Arbeiten und die Einführung in die Glykoanalyse danke ich Herrn Dr. Stefan Müller.

Mein herzlicher Dank gilt allen Kollegen für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre. Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Frank Zaucke für seine ständige Hilfsbereitschaft, das Korrekturlesen dieser Arbeit und das regelmäßige Diskutieren der Fußballergebnisse.

## Kurzzusammenfassung

Unterschiedlich glykosylierte BM-40-Isoformen wurden rekombinant exprimiert sowie aus Gewebe isoliert. BM-40 trägt jeweils nur ein N-glykosidisch verknüpftes Oligosaccharid. Rekombinant exprimiertes BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen sowie BM-40 aus Maus-EHS-Tumor tragen darüber hinaus wahrscheinlich keine weiteren posttranslationalen Modifizierungen. Dagegen besitzt BM-40 aus EBNA-293-Zellen, SaOS-2-Zellen, humanen Blutplättchen und humanem Knochen weitere, bisher nicht identifizierte posttranslationale Modifizierungen. Die Aufklärung der N-Glykan-Strukturen ergab für rekombinantes BM-40 aus EBNA-293-Zellen sowie BM-40 aus Blutplättchen nur bi- und triantennäre komplexe N-Glykan-Strukturen, bei denen auch das Vorhandensein einer core-Fukosylierung und eines „bisecting“ GlcNAc möglich war. In BM-40 aus SaOS-2-Zellen und Maus-EHS-Tumor treten nur biantennäre N-Glykan-Strukturen auf, größtenteils vom komplexen Typ und mit core-Fukosylierung. Ein geringer Anteil trägt Hybrid-Strukturen. Nur auf BM-40 aus MHH-ES-1-Zellen bzw. aus humanem Knochen wurden N-Glykane vom Oligomannose-Typ gefunden. BM-40 aus beiden Quellen weist zusätzlich noch komplexe und aus MHH-ES-1-Zellen auch Hybrid-Typ Strukturen auf. In einem Zellkulturmodell einer mineralisierten Knochenmatrix wurde in Immunfluoreszenzuntersuchungen nur eine geringe Colokalisation von BM-40 mit Kollagen I beobachtet. BM-40 wird in diesem Zellkulturmodell in die extrazelluläre Matrix eingebaut, ein Einbau in Hydroxylapatit-Kristalle wurde erst nach dreiwöchiger postkonfluenter Kultivierung unter mineralisierenden Bedingungen detektiert.

## Abstract

Differentially glycosylated BM-40 isoforms were recombinantly expressed or isolated from tissue. BM-40 carries only one N-linked oligosaccharide and both recombinant BM-40 from MHH-ES-1 cells and BM-40 from mouse EHS-tumor appear to carry no further posttranslational modifications. BM-40 from the other investigated sources (EBNA-293 cells, SaOS-2 cells, human platelets, human bone) contain not identified groups adding to their mass. N-glycan analysis of BM-40 from EBNA-293 cells and from human platelets revealed bi- and triantennary complex type structures, in part with core-fucosylation and a bisecting GlcNAc. BM-40 from SaOS-2 cells and mouse EHS-tumor possesses only biantennary N-glycan structures, for the most part of complex type and with a core-fucosylation, while a small part carried hybrid-type structures. High-mannose type structures were only found in BM-40 expressed by MHH-ES-1 cells and isolated from human bone. In both cases also complex type structures were present and BM-40 from MHH-ES-1 cells additionally contained hybrid-type structures.

The localization of BM-40 in a cell culture model for formation of a mineralized bone matrix was also investigated. BM-40 was only partially colocalized with collagen I as shown by immunostaining of cultured SaOS-2 cells. BM-40 was present in the extracellular matrix and incorporation in hydroxyapatite crystals was detectable after three weeks of postconfluent cultivation under mineralizing conditions.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Brigitte Kaufmann  
geb. Krüger  
Am Weyerhof 2  
50226 Frechen  
Telefon: 02234/274337

\* 27.05.1970 in Herten  
verheiratet

## Schulbildung

1976 - 1980	Grundschule in Herten
1980 - 1982	Gymnasium in Herten
1982 - 1989	Gymnasium in Lennestadt
	Abschluß: Abitur

## Berufsausbildung

08/1989 - 07/1992	Ausbildung zur Physikalisch-Technischen Assistentin an der Höheren Berufsfachschule in Bochum
-------------------	--

## Studium

10/1992 – 09/1997	Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum  Diplomarbeit bei Prof.Dr. B.-J. Benecke am Lehrstuhl für Biochemie, Fakultät Chemie, Ruhr-Universität Bochum Thema: Untersuchungen zum Beitrag der 5'-terminalen Sequenzen für die Transkription des 7SL-RNA-Gens Abschluß: Diplom-Biochemikerin
seit 11/1997	Wissenschaftliche Mitarbeit bei Prof. Dr. Paulsson, Institut für Biochemie II, Medizinische Einrichtungen der Universität zu Köln, Beginn des Promotionsstudiums an der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln ab 04/98